

**Untersuchungen
über die petrolätherlöslichen Lipidfraktionen von
Endomycopsis vernalis LUDWIG
und Torulopsis utilis (HENNEBERG) LODDER**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

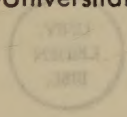
**vorgelegt von
Heidemarie Fischer
aus Ernstthal/Rennsteig**

Marburg 1975

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

**Untersuchungen
über die petrolätherlöslichen Lipidfraktionen von
Endomycopsis vernalis LUDWIG
und Torulopsis utilis (HENNEBERG) LODDER**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**



vorgelegt von

**Heidemarie Fischer
aus Ernstthal/Rennsteig**

Marburg 1975

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg



Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am:	15. April 1975
Tag der mündlichen Prüfung:	23. April 1975
Berichterstatter:	Prof.Dr. H. Kating
Mitberichterstatter:	Prof.Dr. S. Ebel

Herrn Professor Dr. H. Kating danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, für seine Förderung und die großzügige Bereitstellung von Sachmitteln.

Herr Professor Dr. S. Ebel, Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität, Marburg, ermöglichte die Durchführung der quantitativen Bestimmungen mittels Verkohlungs-DC. Dafür möchte ich ihm, sowie Herrn Apotheker P. Post, der die Programme zur Auswertung dieser Bestimmungen erstellte, an dieser Stelle danken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Material und Methoden	3
I. Versuchsorganismen und Kulturmethoden	3
1. Versuchsorganismen	3
2. Anzucht und Nährlösung	3
3. Kulturansätze	4
a) Oberflächenkulturen	4
b) Submerskulturen	5
4. Ernte	5
a) Oberflächenkulturen	5
b) Submerskulturen	6
II. Analysenmethoden	7
1. Aufschluß der Hefezellen und Lipidextraktion	7
a) Gefriertrocknung und Zellaufschluß durch Verreiben mit Kieselgur	7
b) Zellaufschluß durch Ultraschall	7
c) Zellaufschluß mit einer Kugelmühle	8
d) Zusammenfassung der angewendeten Aufschlußverfahren	8
2. Trennung der Petrolätherextrakte in Lipidgruppen und ihre Identifizierung	8
a) Trennung der Petrolätherextrakte in einzelne Lipidgruppen	8
b) Analysen der Lipidgruppen	9
c) Umesterung der Acylglycerine und Sterinester	9
d) Dünnschichtchromatographie der Reaktionsprodukte	10
e) Methylierung der freien Fettsäuren und Dünnschichtchromatographie der Fettsäuremethylester	10

	Seite
f) Acetylierung der Sterine und Dünnschicht- chromatographie der Sterinacetate	10
g) Dünnschichtchromatographische Analyse der Fettsäuremethylester	11
h) Gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester	12
3. Bestimmung der Säurezahlen	14
4. Schmelzpunktbestimmung	14
5. Quantitative Bestimmung der Lipidgruppen durch Verkohlungs-Dünnschichtchromatographie und Remissions- bzw. Simultan-Messung	14
a) Herstellen und Präparieren der Dünnschichtplatten	14
b) Eichlösungen, Analysenlösungen, Auftragmethode	15
c) Remissions- und Transmissions-Messung mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer	16
α) Methode der Remissionsmessung	16
β) Methode der Simultanmessung	17
C. Ergebnisse	18
I. Zellaufschluß und Extraktion der Lipide	18
II. Vorversuche für die quantitativen Bestimmungen durch Verkohlungs-Dünnschichtchromatographie und Messung der Remissionsminderung bzw. der Transmissionsminderung	25
III. Untersuchungen über die petrolätherlöslichen Lipide von E. vernalis und T. utilis	33
1. Lipidbildung in Abhängigkeit vom Alter der Kultur bei stickstoffreicher Ernährung	33
a) Qualitative Untersuchung der Lipidkomponenten	34
b) Trockengewichts- und Lipidproduktion sowie quantitative Untersuchungen der Lipidkomponenten	37
α) E. vernalis	37
β) T. utilis	40
c) Analyse der Fettsäuren der Lipidkomponenten	41

	Seite
2. Einfluß der Wachstoffsstoffe Biotin und Aneurin auf die Lipidbildung von <i>E. vernalis</i> und <i>T. utilis</i>	50
a) Trockengewichts- und Lipidproduktion sowie quantitative Untersuchungen der Lipidkompo- nenten	51
b) Analysen der Fettsäuren der einzelnen Lipid- komponenten	56
3. Lipidbildung in Abhängigkeit von der Stickstoff- ernährung	59
a) Aufzuchtulturen	59
α) Trockengewichts- und Lipidproduktion sowie Analyse der Lipidkomponenten	60
β) Analyse der Fettsäuren der einzelnen Lipid- komponenten	62
b) Umpflanzkulturen	64
α) Stickstoffreiche Vorzucht und Umpflanzung auf N-Mangel-Nährmedium	65
αα) Trockengewichts- und Lipidproduktion sowie Analyse der Lipidkomponenten	65
ββ) Analyse der Fettsäuren der einzelnen Lipid- komponenten	67
β) Vorkultivierung auf N-Mangel-Nährlösung	67
αα) Trockengewichts- und Lipidproduktion sowie quantitative Bestimmungen der Lipidkomponenten	68
ββ) Analyse der Fettsäuren der einzelnen Lipid- komponenten	70
4. Lipidbildung bei Zusatz von Natriumacetat zum Nährmedium und bei Natriumacetat als einziger Kohlenstoffquelle	73
a) Trockengewichts- und Lipidproduktion sowie quantitative Verteilung der Lipidkomponenten	74
b) Analyse der Fettsäuren der einzelnen Lipid- komponenten	81

	Seite
5. Lipidbildung bei Submerskultur	85
6. Mikroskopische Untersuchung zur beginnenden Neutral- lipidbildung bei <i>E. vernalis</i>	89
D. Diskussion	93
E. Zusammenfassung	100
F. Anhang	104
I. Tabellenanhang I : Ergebnisse der quantitativen Verkohlungs-Dünnschichtchromatographie	104
II. Tabellenanhang II: Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Gaschromatogramme	108
III. Lösungsmittel	128
G. Literaturverzeichnis	129

A. Einleitung und Problemstellung

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurden erstmals genauere Untersuchungen über die Fettbildung von Mikroorganismen durchgeführt. Schon 1878 erschien eine Arbeit, in der u.a. 5% Fett als Bestandteil der Bierhefe angegeben wurde (C.v. NÄGELI und O.LÖW, 1878, 1880).

Zahlreiche folgende Untersuchungen verschiedener Hefearten und Stämme zeigten, daß einige bestimmte Hefen zur Fettbildung neigten, andere weniger, daß andererseits aber auch durch Variation der äußeren Bedingungen wie Nährlösung, Sauerstoffversorgung und Temperatur bei einigen Hefestämmen die Fettbildung beeinflußt werden konnte. Bezüglich der älteren Literatur zu diesem Thema siehe M. STEINER (1957). Viele dieser Untersuchungen wurden u.a. auch mit dem Ziel durchgeführt, die Hefefette und Eiweiße für die menschliche Ernährung nutzbar zu machen. S.HEIDE (1939), H.RAAF (1941) und M.STEINER (1941) waren die ersten, die bei N-Mangelkulturen von Hefen auf die prozentuale Steigerung der Fettbildung bei gleichzeitiger Verminderung der Eiweißsynthese hinwiesen. S.HEIDE untersuchte die Fettbildung bei *Endomycopsis vernalis* LUDWIG in Oberflächenkulturen und beschrieb das Anwachsen der gebildeten Fettmenge bei stufenweise reduziertem Stickstoffgehalt des Nährmediums und mit fortschreitendem Alter der Kultur. Die unter den gleichen äußeren Bedingungen - Oberflächenkultur mit Stickstoffmangel - gebildeten Lipide dieser Hefe wurden von B.WITTER (1974) auf ihre Zusammensetzung hin untersucht, wobei jedoch nur die Lipide des nach 6 Tagen geernteten Mycels analysiert wurden.

Als leicht submers züchtbarer Hefestamm wurde in neuerer Zeit *Torulopsis utilis* (HENNEBERG) LODDER unter verschiedenen Kulturbedingungen für Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel herangezogen. Bei N-Mangelkulturen wurden vornehmlich die Sauerstoffversorgung (C.M.BROWN und A.H.ROSE, 1969; T.BABIJ u.Mitarb., 1969) und die Temperatur (McMURROUGH und A.H.ROSE, 1971; F.MEYER und K.BLOCH, 1963) variiert sowie die Glucose-Kohlenstoffquelle durch n-Alkane (H.KRAUEL u.Mitarb., 1973) oder durch Natriumacetat (A.J.FULCO, 1967) ersetzt.

Es wurden auch die zellfreien Extrakte von *T. utilis* auf die Fähigkeit hin untersucht, nachträglich zugefügte Fettsäuren bzw. Phospholipid-Fettsäuren zu verändern (F. MEYER und K. BLOCH, 1963; L. TALAMO u. Mitarb., 1973; CHIN YUAN und K. BLOCH, 1961).

Auch durch Änderung der Kulturmethode sind Unterschiede hinsichtlich Menge und Art der von *T. utilis* gebildeten Lipide beobachtet worden (P.S.S. DAWSON und B.M. CRAIG, 1966; P.S.S. DAWSON, 1970). 1966 untersuchten P.S.S. DAWSON und B.M. CRAIG die Änderung der gesamten Fettsäuren im Verlauf der Kulturdauer von "batch"-Kulturen, "chemostat"-Kulturen und Synchronkulturen. 1970 wurden von P.S.S. DAWSON bei gleichen Kulturmethoden genauere Angaben über die Bildung der Neutrallipide bei Stickstoffmangel-Kulturen mit verschiedenen Mengen an Glucose im Nährmedium gemacht. Jedoch fehlten in diesen Untersuchungen quantitative Angaben über die Lipidkomponenten und die Zusammensetzung der Fettsäuren der einzelnen Fraktionen.

Ausgangspunkt der nachfolgend geschilderten Untersuchungen war der Befund, daß der prozentuale Fettgehalt bei *E. vernalis* bei N-Mangelkulturen stark ansteigt, während bei *T. utilis* unter gleichen N-Mangelbedingungen kaum eine Zunahme des Ätherlöslichen festzustellen ist (s. hierzu G. DREPHAL, 1969; L. ECKERT, 1968; H. KATING, 1955, 1959; M. MAAS-FÖRSTER, 1955). Ziel dieser Arbeit war es deshalb, das offensichtlich unterschiedliche Lipidbildungsvermögen beider Arten unter variierten Kulturbedingungen durch qualitative und quantitative Analysen der Lipidkomponenten näher zu untersuchen.

B. Material und Methoden

I. Versuchsorganismen und Kulturbedingungen

1. Versuchsorganismen

Die Untersuchungen wurden mit den Hefen *Endomycopsis vernalis* LUDWIG und *Torulopsis utilis* (HENNEBERG) LODDER durchgeführt. Die Stammkulturen aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn wurden auf Malzagar in Schrägagararröhrchen gehalten und etwa alle 4 Wochen auf neue Schrägagararröhrchen übergeimpft. Zusammensetzung des Malzagars: 2 g Agar-Agar (gereinigt für die Bakteriologie, Fa. MERCK), 4 g Biomalz (Fa. FRANKLE & ECK OHG.), 3 mg Streptomycinsulfat (Fa. GRÜNENTHAL), ad 100 ml deionisiertes Wasser.

2. Anzucht und Nährlösung

Die beiden Hefen wurden entweder nach den von S. HEDE (1939) und H. RAAF (1941) beschriebenen Oberflächenkulturen-Verfahren oder als Submerskulturen angezogen. Erstere Anzucht erfolgte in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm; submers wurden die Hefen in 1 - 4 Ltr. großen Standkolben angezogen, wobei durch einleitete keimfreie Luft mit Hilfe einer Membranpumpe für eine gute Durchlüftung des Kulturansatzes gesorgt wurde.

Die Versuchsorganismen wurden auf einer rein synthetischen Nährlösung nach W. WÖLTJE (1918) kultiviert:

- 1,0 g L-Asparagin (für biochemische Zwecke, Fa. MERCK)
- 0,5 g Kaliumdihydrogenphosphat p.A. (Fa. MERCK)
- 0,25 g Magnesiumsulfat $7 \text{ H}_2\text{O}$ p.A. (Fa. MERCK)
- 7,5 g Saccharose reinst (Fa. MERCK)
- ad 100 ml deionisiertes Wasser.

Die Zusammensetzung dieser Grundnährlösung wurde für die einzelnen Versuchsanordnungen gelegentlich abgeändert, indem entweder die N-Quelle auf $1/2$, $1/4$ oder $1/8$ der normalen Menge (= N-Mangelkulturen) herabgesetzt oder die C-Quelle Saccharose in einigen Ansätzen durch Natriumacetat ganz oder teilweise ersetzt wurde.

Die Nährlösung wurde dann mit Salzsäure auf pH 4,2 (pH der WÖLTJE-Lösung) eingestellt. Bei einigen Versuchsanordnungen wurde der Nährlösung Biotin (13 $\mu\text{g/l}$) bzw. Biotin und Aneurin (50 $\mu\text{g/l}$) zugesetzt.

Die Nährlösungen wurden für die Anzucht auf Petrischalen in Erlenmeyerkolben, für die Submerskulturen sofort in den Kulturgefäßen dreimal innerhalb von 3 Tagen im Dampftopf fraktioniert sterilisiert.

3. Kulturansätze

Zur Gewinnung des Impfmateri als wurden die Organismen drei bis vier Tage vor Beginn einer Versuchsreihe von den Dauerkulturröhrchen auf frische Schrägagar-röhrchen übergeimpft und bei Zimmertemperatur ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) vorkultiviert.

a) Oberflächenkulturen

Die vorkultivierten Hefen wurden unmittelbar vor dem Ansetzen einer Versuchsreihe in Schüttelkölbchen mit 15 - 25 ml sterilisiertem Leitungswasser übergeimpft; durch Schütteln wurde eine homogene Suspension hergestellt, von der je 0,5 ml zur Animpfung einer Kulturschale verwendet wurden.

Zur Vorbereitung der Kulturschalen wurden zunächst Petrischalen mit je 34 g Quarzsand (gewaschen und geglüht, p.A., Fa.MERCK)¹⁾, für jede Petrischale 2 Rundfilter (Durchmesser: 8,8 cm; Weißband, Fa.SCHLEICHER & SCHÜLL) sowie die notwendige Anzahl an Meßpipetten (20 und 0,5 ml), Pinzetten und rechtwinklig gebogenen Glasstäben 2 h bei 120°C trocken sterilisiert. In die erkalteten mit Quarzsand gefüllten Petrischalen wurden je 14,5 ml der sterilisierten Nährlösung gegeben und auf die getränkte Quarzschicht nacheinander je 2 Rundfilter gelegt. Die Impfsuspension (je 0,5 ml) wurde auf die Rundfilter pipettiert und mit den rechtwinklig gebogenen Glasstäben gleichmäßig darauf verteilt. Dabei wurden gleichzeitig eventuell zwischen den Filtern entstandene Luftblasen entfernt, da an diesen Stellen ein unterschiedliches Wachstum der Pilze eintritt.

- 1) Nach Versuchsabbruch wurde der Quarzsand gesammelt, mit Leitungswasser gewaschen und jeweils 2 h lang mit verdünnter Salzsäure und mit verdünnter Na-Carbonat-Lösung auf dem Wasserbad erhitzt. Nach gründlichem Spülen, zuletzt in deionisiertem Wasser, und Trocknen bei 140°C war der Sand wieder gebrauchsfähig.

Die Versuchsorganismen wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln als sogenannte Aufwuchskulturen angezogen.

Außer den Aufwuchskulturen wurden auch Versuchsreihen mit sogenannten Umpflanzkulturen durchgeführt. Und zwar wurde dann das obere Filterpapier mit der ausgebildeten Pilzdecke auf ein neues Nährmedium in entsprechend vorbereitete Petrischalen umpflanzte.

b) Submerskulturen

Zur Vorkultur wurde die auf Schrägagar vorgezogene Hefe in ein Schüttelkölblehen übergeimpft, das je nach Versuchsansatz entweder 50 ml Nährlösung des Ansatzes oder 50 ml Nährlösung mit normaler Stickstoffmenge enthielt und 18 h auf einer Schüttelmaschine gerade so stark bewegt wurde, daß der Ansatz gut mit Luft versorgt wurde. Von dieser Vorkultur wurden jeweils 7 ml für 1000 ml Nährlösung der Hauptkultur eingesetzt.

Ansatz der Hauptkulturen:

Entsprechend der Größe des Ansatzes wurden 1 - 4 l -Standkolben mit 500 - 3000 ml Nährlösung gefüllt und mit einem zweifach durchbohrten Gummistopfen verschlossen. In die Bohrungen des Stopfens wurden jeweils eine Kapillare, die bis zum Boden des Kolbens reichte, und ein kurzes, rechtwinklig abgebogenes Glasrohr eingesetzt. Die Kolben wurden wie angegeben sterilisiert. Durch die Kapillare wurde mit Hilfe einer Membranpumpe Luft in den Kulturansatz geblasen, so daß die Hefe während des Wachstums ausreichend mit Sauerstoff versorgt wurde. Die Kultur wurde bei $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln gezogen.

4. Ernte des Untersuchungsmaterials

a) Oberflächenkulturen

Zur Ernte wurde die Myceldecke mit einem breiten Spatel quantitativ vom Rundfilter abgestreift. Das in einem kleinen Zentrifugengläschen (Erntegläschen) mit bekanntem Leergewicht durch Zentrifugieren bei 3500 U/min gesammelte Material wurde zweimal in Wasser suspendiert und sofort zentrifugiert.

Das erhaltene Pilzmaterial (Frischmaterial) wurde entweder bei -25°C bis zum Zellaufschluß eingefroren oder sofort in einer Gefriertrocknungsanlage getrocknet.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurde das Gewicht des geernteten Mycels jeweils einer Petrischale nach dem Trocknen bestimmt. Aus mindestens drei Schalen wurde der Mittelwert bestimmt.

b) Submerskulturen

Zum Erntezeitpunkt wurde das Mycel in großen Zentrifugengläsern mit 3500 U/min in einer gekühlten Zentrifuge von der Nährlösung getrennt. Da bei größeren Ansätzen die gesammelte Menge nicht auf einmal zentrifugiert werden konnte, wurde der Kulturansatz bei Beginn der Ernte in ein Eisbad gestellt, so daß während der Erntezeit kein größerer Stoffwechselumsatz mehr stattfinden konnte. Nach der Ernte des gesammelten Mycels wurde dieses noch zweimal mit Wasser gewaschen und dann bei -25°C eingefroren.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurden mindestens dreimal je 2,0 ml Frischmaterial in kleine Erntegläschen mit bekanntem Gewicht gegeben und in der Gefriertrocknungsanlage getrocknet. Das Gewicht des getrockneten Mycels wurde bestimmt und das Erntegewicht der Gesamtkultur berechnet.

II. Analysenmethoden

1. Aufschluß der Hefezellen und Lipidextraktion

a) Gefriertrocknung und Zellaufschluß durch Verreiben mit Kieselgur

Das Frischmaterial wurde in den Erntegläschen in der Gefriertrocknungsanlage "Delta II" (Fa. CHRIST) bei -60°C eingefroren und anschließend bei -10°C und einem Druck von 10^{-3} Torr 24 h getrocknet. Das getrocknete Pilzmaterial wurde gewogen, mit etwa der gleichen Menge Kieselgur (gereinigt und geglüht, Fa. MERCK) verrieben und in Extraktionshülsen (Fa. SCHLEICHER & SCHÜLL, Nr. 603 H) von bekanntem Gewicht mit je 20 ml Petroleumbenzin ($40-60^{\circ}\text{C}$, Fa. MERCK) in Soxhlet-Apparaturen 5 h extrahiert. Nach dem Trocknen im Exsiccator wurde zur Ermittlung der extrahierten Lipidmenge erneut gewogen.

b) Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung

Das geerntete bei -25°C eingefrorene und wieder aufgetaute Pilzmaterial wurde in Portionen zu je 2,0 ml aufgeteilt. Je 2 ml wurden mit 18 ml deionisiertem Wasser quantitativ in einen Metallbecher (Durchmesser 2,75 cm, Länge 7,4 cm) übergeführt und unter Kühlung mit einer Eis/Methanol-Mischung ohne oder mit Zusatz von 6 ml Glasperlen, Durchmesser 0,5 mm, mit dem Ultraschallstab des Ultra Sonic (Fa. BRANDSON, Loosdrecht , Niederlande) 20 min auf Schaltstufe 6, mit einer Höchstleistung von 10 A beschallt.

Die zertrümmerten Zellen wurden mit Hilfe einer Glasfilternutsche G 1 (Porengröße: $90 - 150\text{ }\mu\text{m}$) von den Glasperlen getrennt. Durch viermaliges Waschen mit je 10 ml deionisiertem Wasser wurden die Zellreste quantitativ von den Glasperlen abgespült. Das Filtrat wurde zum Zählen der Zellen auf 100,0 ml ergänzt, eine Spur wurde zum Zählen der Zellen entnommen, dann wurde 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Dabei trennen sich die Zellwände von dem mit Wasser verdünnten Zellinhalt. Die Zellwände wurden noch zweimal mit deionisiertem Wasser gewaschen, das Waschwasser wurde dem Zellinhalt zugefügt. Die gewaschenen Zellwände wurden wie in II.1.a. beschrieben gefriergetrocknet und der Fettextraktion unterworfen.

Der mit Wasser verdünnte Zellinhalt wurde fünfmal mit je 15 ml Petroleumbenzin 40 - 60° (und danach fünfmal mit je 15 ml Chloroform) ausgeschüttelt. Der von Lösungsmittel befreite Fettextrakt wurde gewogen.

c) Zellaufschluß mit einer Kugelmühle

Proben von je 2 ml Frischmaterial wurden mit 18 ml Wasser verdünnt und in einem mit Glasperlen (Durchmesser 0,95 mm oder 1,5 mm) gefüllten Metallbecher (Durchmesser 2,7 cm; Länge 9 cm) mit dem Glasperlenhomogenisator Vi 2 (Fa. BÜHLER, Tübingen) unter Eiskühlung 20 min lang gemahlen. Die wäßrige Suspension der Zellbruchstücke wurde wie in II.1.b. beschrieben weiter aufgearbeitet.

d) Zusammenfassung der angewendeten Aufschlußverfahren

Bei Anwendung aller drei Aufschlußverfahren auf die Ernte aus einem Kulturansatz ergeben sich fünf verschiedene Rohextraktmengen, die im einzelnen untersucht wurden:

- α) Gefriertrocknung: Petrolätherextrakt der ganzen Zellen
- β) Aufschluß durch Ultraschall: Petrolätherextrakt des Zellinhaltes
Petrolätherextrakt der Zellwände
- γ) Aufschluß mit der Kugelmühle: Petrolätherextrakt des Zellinhaltes
Petrolätherextrakt der Zellwände

Diese Petrolätherextrakte wurden für quantitative und halbquantitative Bestimmungen in Analysengläschen genau gewogen und unmittelbar vor der Untersuchung quantitativ in Meßkolben übergeführt, die bis zur Marke mit gereinigtem Chloroform aufgefüllt wurden.

2. Trennung der Petrolätherextrakte in Lipidgruppen und ihre Identifizierung

a) Trennung der Petrolätherextrakte in einzelne Lipidgruppen

Die Methode zur Gruppentrennung der Lipide von H.K. MANGOLD und D.C. MALINS (1960) wurde mit dem Ziele variiert, für alle Substanzgruppen auch bei präparativer DC geeignete Rf-Werte zu erhalten.

Als stationäre Phase wurden Kieselgel G -Platten verwendet: Je 5 Platten, 20 x 20 cm, wurden mit einer Anreibung von 30 g Kieselgel G, Typ 60 (Fa. MERCK), in einer Lösung von 10 mg Pyranin (3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfonsaures Natrium, Fa. BAYER) in 55 ml Wasser 200 μ m dick beschichtet, zum Abbinden 12 h im Dunkeln liegen gelassen und vor dem Gebrauch 2 h bei 120°C aktiviert. Die Chromatogramme wurden erst im Fließmittelgemisch n-Hexan/Diäthyläther/Eisessig = 80/20/1 ; v/v/v 11 cm hoch entwickelt, danach im System n-Hexan/Diäthyläther (95/4,5 ; v/v).

Nach dem Abdunsten des Fließmittels erschienen die Neutrallipide im UV-Licht (366 nm) als hellblaue Flecken auf gelbgrünem Grund. Phospholipide und eventuell entstandene Zerfallsprodukte der Acylglycerine und freien Fettsäuren erschienen dunkelviolett.

b) Analysen der Lipidgruppen

Die Zuordnung der einzelnen Zonen zu Lipidgruppen erfolgte durch vergleichende DC mit Vergleichssubstanzen , durch Anwendung spezifischer Sprühreagentien zum Nachweis der Sterine, wie Liebermann-Burchardt-Reagenz und Naphthochinonsulfonsäure-Reagenz (E. STAHL, 1966), sowie durch Identifizierungsanalysen der Zonen nach präparativer DC.

c) Umestern der Acylglycerine und Sterinester

Acylglycerine und Sterinester wurden nach K.OETTE und M.DOSS (1967) mit Natriummethylat umgeestert. Hierzu wurden von 1 oder 2 Platten die entsprechenden Zonen abgekratzt und in Reagenzgläsern mit 1 - 3 ml 2 N Natriummethylat-Lösung (zur Herstellung wurden 4,6 g Natrium p.A. in 100 ml Methanol p.A. gelöst) 2 min zum Sieden erhitzt. Nach dem Neutralisieren mit 2 N methanolischer Salzsäure (zur Herstellung wurden 20 ml rauchende Salzsäure p.A. mit 80 ml Methanol p.A. verdünnt) wurde mit 10 ml Chloroform versetzt, die Mischung über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und das Kieselgel mit weiteren 15 ml Chloroform eluiert. Die Zonen der umgeesterten Acylglycerine wurden anschließend mit 25 ml Äthanol zur Gewinnung der Polyalkohole eluiert. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer bei höchstens 30°C abgezogen.

d) Dünnschichtchromatographie der Reaktionsprodukte

Die nach II.2.c. erhaltenen Substanzen wurden erneut auf Kieselgel G-Platten mit Pyraninzusatz im Fließmittelgemisch für die Gruppentrennung chromatographiert. Als Vergleichssubstanzen wurden Palmitinsäuremethylester, Glycerin und Ergosterin, außerdem jeweils die entsprechenden Vergleichssubstanzen aus der Gruppentrennung aufgetragen. In diesem System bleiben die Polyalkohole an der Startlinie. Sie werden deshalb wieder von der Platte abgenommen, mit Äthanol eluiert und dann auf lufttrockenen Kieselgel G-Platten in einer Mischung aus Chloroform/Aceton/5 N Ammoniak (10 / 80 /10) entwickelt (E.STAHL, 1966).

e) Methylierung der freien Fettsäuren und Dünnschichtchromatographie der Fettsäuremethylester (FsME)

Die freien Fettsäuren wurden nach der Gruppentrennung mit Chloroform eluiert und nach dem Abdunsten des Lösungsmittels mit Diazomethan in Äther versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Das Diazomethan wurde durch Versetzen einer eisgekühlten Lösung von 2 g p-Toluylsulfonyl-methylnitrosamid in 30 ml Äther mit 20 ml 0,5 N äthanolischer Kalilauge und anschließender Destillation in einer Äthervorlage oder direkt in die Ätherlösung der Fettsäuren gewonnen (K.F.SCHULTE und G.RÜCKER, 1966). Die erhaltenen FsME wurden auf Kieselgel G-Platten mit Pyranin im Fließmittelgemisch Hexan/Äther (80/20 ; v/v) mit Vergleichssubstanzen chromatographiert. In diesem System haben Hydroxy-FsME, Epoxy-FsME und Dicarbon-FsME kleinere R_f -Werte als die n FsME (K.D.REHM, 1967).

f) Acetylierung der Sterine und DC der Sterinacetate

Die freien Sterine und die aus der Umesterung gewonnenen Sterine wurden mit Chloroform vom Kieselgel eluiert und nach dem Abdunsten des Lösungsmittels in die Acetate übergeführt (G.E.LIER und K.L.SMITH, 1968). Hierzu wurden je 10 mg Sterine mit einem Acetylierungsgemisch aus 1 ml Acetanhydrid und 2 ml Pyridin versetzt und über Nacht stehengelassen. Dann wurde vorsichtig Methanol zugesetzt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Die Sterinacetate wurden auf Kieselgel G-Platten mit Pyranin als Indikator im System n-Hexan/Diäthyläther/Eisessig (80/20/1 ; v/v/v) mit Vergleichssubstanzen chromatographiert.

g) Dünnschichtchromatographische Analyse der FsME

α) Trennung der FsME in gesättigte und ungesättigte Verbindungen

Die ungesättigten FsME lassen sich nach der Methode von E. JANTZEN und H. ANDREAS (1960) in Hg^{II} -acetat-Addukte überführen und als Addukte dünn-schichtchromatographisch von den gesättigten FsME und nach der Anzahl der Doppelbindungen trennen. Zur Herstellung der Hg^{II} -acetat-Addukte wurden je 50 mg FsME mit einer Mischung aus 1,4 g Hg^{II} -acetat, 25 ml Methanol, 0,25 ml Wasser und 0,1 ml Eisessig versetzt und 48 h im Dunkeln stehengelassen. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 15 ml Chloroform suspendiert und zur Entfernung des überschüssigen Hg^{II} -acetats fünfmal mit je 10 ml Wasser gewaschen. Die über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknete Chloroform-Lösung wurde bei Zimmertemperatur eingeeengt.

Die Trennung der gesättigten FsME von den Hg^{II} -acetat-Addukten der ungesättigten FsME erfolgte dünn-schichtchromatographisch über ein Adsorbensgemisch aus 3 Teilen Kieselgel H und 7 Teilen Kieselgur G (H. WAGNER und P. POHL, 1964) im Fließmittel Petroläther (60-80) / Diäthyläther (80/20 ; v/v) (nach H. K. MANGOLD und R. KAMMERFECK, 1961).

Nach dem Entwickeln bis zu einer Höhe von ca. 16 cm lagen die gesättigten FsME in diesem System dicht unter der Fließmittelfront (sie erschienen in der Jodkammer als braunes Band), die Hg^{II} -acetat-Addukte der ungesättigten FsME blieben an der Startlinie und wurden durch Besprühen mit einer 0,1 %igen äthanolischen Dithizonlösung als rosafarbenes Band sichtbar. Die markierten Zonen wurden von der Platte abgeschabt und die Fraktion der gesättigten FsME mit Chloroform eluiert.

Die ungesättigten FsME wurden durch die Adduktspaltung nach A. GLASER u. Mitarb. (1962) aus der Zone der Hg^{II} -acetat-Addukte wiedergewonnen. Dazu wurde das von den Platten abgekratzte Adsorbens mit einer Mischung aus 0,8 ml Salzsäure (37 %) und 6 ml einer 5 %igen methanolischen Ammoniumthiocyanat-Lösung für je 100 mg Addukte versetzt und 1 h unter mehrmaligem Umschwenken in Dunkeln stehengelassen.

Anschließend wurde der Ansatz mit 30 ml Wasser verdünnt und fünfmal mit je 10 ml Petroläther (40-60) ausgeschüttelt. Die vereinigten, über Natriumsulfat sicc. getrockneten Petrolätherextrakte wurden im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt.

Gesättigte und ungesättigte FsME wurden gaschromatographisch analysiert.

g) Dünnschichtchromatographische Trennung der ungesättigten FsME und deren Identifizierung

Die Trennung in gesättigte und ungesättigte FsME wurde wie oben beschrieben vorgenommen. Nach dem Entwickeln in Petroläther (40-60) / Diäthyläther (80/20 ; v/v) bis zu einer Höhe von 16 cm wurde ein zweites Mal chromatographiert im System n-Propanol/Eisessig (100/1 ; v/v) über eine Laufstrecke von 12 cm. Dabei trennten sich die Hg^{II} -acetat-Addukte nach der Anzahl der Doppelbindungen der entsprechenden FsME (H. KATING u. Mitarb., 1970). Die einzelnen Zonen der Addukte der Mono-, Di- und Trien-FsME wurden von der Platte abgenommen, der Adduktspaltung nach A. GLASER u. Mitarb. (1962) unterworfen und gaschromatographisch analysiert.

Zur weiteren Identifizierung wurden die getrennten ungesättigten FsME mit Platin-oxid als Katalysator in Tetrahydrofuran als Lösungsmittel hydriert. Von den Hydrierungsprodukten der Di- und Trien-FsME wurden Schmelzpunkte bestimmt. Alle Hydrierungsprodukte wurden gaschromatographisch analysiert.

h) Gaschromatographie der FsME

Alle erhaltenen FsME wurden zunächst zur Reinigung auf mit Pyranin imprägnierten Kieselgel G-Platten (s.S. 9) im System n-Hexan/Diäthyläther (80/20 ; v/v) präparativ chromatographiert (s.S. 9), von den Platten abgekratzt, mit gereinigtem Chloroform eluiert und gaschromatographisch analysiert.

Die gaschromatographischen Analysen der FsME wurden mit dem Gaschromatographen F 7 der Fa. PERKIN-ELMER durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Meßverfahren angewendet :

Meßdaten

I. Säule: 1 Paar gepackte Stahlsäulen, PERKIN-ELMER, Typ 42 S 4257,
im Kompensationsbetrieb; Länge: 2 m; innerer Durchmesser:
3 mm; Stationäre Phase: 2,5 % Äthylenglycosuccinat auf Chromo-
sorb G (AW-DMCS), 80-100 mesh;

Säulen-
temperatur: Programmiert von 50 - 180°C, Anstiegsrate 5°C/min,
anschließend isotherm bei 180°C;

Trärgas: Stickstoff; Strömungsgeschwindigkeit: 28 ml/min;

Temperatur des Einspritzblocks: 270°C

Temperatur des Detektors: 300°C

Papiervorschub: 10 mm/min

Einspritzmenge: je nach Konzentration der Lösung, maximal jedoch 0,2 µl.

II. Säule: Wie I., aber:

Säulentemperatur: isotherm bei 160°C;

Strömungsgeschwindigkeit: 25 ml/min.

III. Säule: 1 gepackte Stahlsäule, PERKIN-ELMER, Typ 606 348; Länge: 2 m;
innerer Durchmesser: 3 mm; Stationäre Phase: 10 % Diäthylen-
glycolsuccinat auf Chromosorb W, AW, 80-100 mesh;

Säulentemperatur: 185°C

Trärgas: Stickstoff; Strömungsgeschwindigkeit: 25 ml/min;

Temperatur des Einspritzblocks: 270°C

Temperatur des Detektors: 300°C

Papiervorschub: 10 mm/min

Einspritzmenge: je nach Konzentration der Lösung, maximal jedoch 0,2 µl.

Die Identifizierung der FsME erfolgte durch Vergleich der relativen Retentions-
zeiten, bezogen auf Palmitinsäure-ME als Standard, mit denen der authentischen
FsME.

Die quantitative Bestimmung der einzelnen Fettsäuren im Gesamtgemisch der FsME erfolgte aus den isothermen Fraktogrammen (Methode II, s.S. 13) der gereinigten Gesamt-FsME nach der Näherungsmethode "Höhe mal Gesamtretentionszeit" unter Verwendung des Korrekturfaktors

$$f = \frac{M}{n \cdot 12}$$

nach R.G.ACKMANN, 1964 (s.auch R.KAISER, 1965).

(M = Molekulargewicht; n = Zahl der verfügbaren C-Atome)

3. Bestimmung der Säurezahlen

Zur Bestimmung der Säurezahlen wurden von den Meßlösungen der Fettextrakte soviel in 25 ml -Erlenmeyer-Weithalskolben pipettiert, daß etwa 3 - 7 mg Fett-einwaage pro Bestimmung titriert werden konnten. Nach dem Verdunsten des Chloroforms wurde der Extrakt in 3,00 ml einer vorher gegen Alkaliblau neutralisierten Mischung aus abs. Äthanol p.A. und wasserfreiem Benzol (1 / 1 ; v/v) aufgenommen und mit 0,025 N wäßriger Natronlauge gegen Alkaliblau (0,2 % in Äthanol) titriert (s. Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd.IV, 1969).

4. Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte der FsME wurden mit dem Mikroskopheiztisch (Fa.LEITZ) bestimmt.

5. Quantitative Bestimmung der Lipidgruppen durch Verkohlungs-DC und Remissions- bzw. Simultan-Messung²⁾

a) Herstellen und Präparieren der Dünnschichtplatten

Für die quantitativen Bestimmungen wurden selbstbeschichtete Platten verwendet, die mit Kieselgel G für die Dünnschichtchromatographie, Typ 60 (Fa.MERCK) in einer Schichtdicke von 200 µ, wie auf S. 9 beschrieben, hergestellt wurden.

²⁾ Die Durchführung der Messungen erfolgte im Pharmazeutisch-Chemischen Institut der Philipps-Universität, Marburg, bei Herrn Prof.Dr. S.Ebel. Die Programme zur Auswertung wurden von Herrn Apotheker Peter Post unter Anleitung von Herrn Prof. Ebel erstellt.

Vor dem Aktivieren wurden die Platten mit einer Präpariernadel in 10 mm breite Bahnen unterteilt. Da die Bestimmungsmethode sauberste Dünnschichtplatten erfordert, wurden diese 2 h in gereinigtem Chloroform entwickelt, dann 2 h bei 120°C reaktiviert. Auf der Platte wurde nur jede zweite Bahn zum Auftragen von Vergleichslösungen bzw. Analysenlösungen benutzt, außerdem blieben jeweils die erste und letzte Bahn einer Platte leer. Die Chromatogramme wurden zuerst 11 cm hoch in einer Mischung aus n-Hexan/Diäthyläther/Eisessig (80/20/1 ; v/v/v) entwickelt, nach dem Abdunsten des Laufmittels erfolgte eine zweite Entwicklung in n-Hexan/Diäthyläther (95/4,5 ; v/v) bis zu einer Höhe von 16 cm.

Die Platten wurden anschließend leicht und gleichmäßig mit einer gesättigten Lösung von Kaliumdichromat in 70%iger wässriger Schwefelsäure besprüht und bei 180°C 25 min lang erhitzt. Die organischen Substanzen waren dann verkohlt und als schwarzbraune Flecken auf grau-weißem Untergrund sichtbar (vgl. M.L.BLANK u.Mitarb., 1964).

b) Eichlösungen, Analysenlösungen, Auftragsmethode

Entsprechend den zu bestimmenden Lipidextrakten wurden Testmischungen hergestellt, die größenordnungsmäßig eine ähnliche prozentuale Zusammensetzung der einzelnen Komponenten hatten wie die Analysen. Das Testgemisch wurde in gereinigtem Chloroform in einem Meßkölbchen gelöst. Diese erste Meßlösung wurde weiter verdünnt, so daß fünf Lösungen mit gleicher prozentualer Zusammensetzung der Lipidkomponenten, aber verschiedener Konzentration entstanden.

Die Analysenlösungen wurden durch Wahl der Meßkölbchen auf eine Konzentration von ca. 80 - 120 mg / 10,00 ml Chloroform eingestellt. Auf die Platten wurden immer gleiche Volumina (10,0 µl) der verschiedenen Lösungen mit Auftragspipetten (Fa. BRAND) strichförmig in einer Breite von 8 mm aufgetragen. Auf jeder Platte wurden die fünf Vergleichslösungen und zwei Analysenlösungen chromatographiert; von den Vergleichslösungen wurde bei der Messung je nach den Mengen der Analysen die schwächste oder die stärkste Konzentration ausgelassen.

c) Remissions- und Transmissions-Messung mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer

α) Methode der Remissionsmessung

Die Messung der Remission der verkohlten Flecken wurde mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer PMQ II (Fa. ZEISS, Oberkochen/Württ.) durchgeführt. Das Chromatogramm wird bei dieser Methode mit monochromatischem Licht unter einem Winkel von 0° (bezogen auf die Oberflächennormale) bestrahlt. Das diffus zurückgestrahlte nicht absorbierte Licht trifft unter 45° auf einen Photomultiplier und erzeugt dort einen dem Strahlungsfluß proportionalen Photostrom, der ein elektrisches Signal für die Anzeige der Remission bildet (Manual für das Zeiss-Gerät). Die Messung der Strahlungsabsorption der verkohlten Flecken erfolgt durch Messung der Remissionsminderung. Diese wurde über eine integrierende Digitalisierung gemessen, die zur Verbesserung des Signal / Rausch-Verhältnisses dient (H. KUSSMAUL, 1972). Um den Gradienten des Grauwertes des Untergrundes auszugleichen, der durch das Besprühen mit Chromschwefelsäure immer entstand, wurde das Chromatogramm-Spektralphotometer als simuliertes Dreistrahlggerät verwendet (H. KUSSMAUL, 1972), so daß der Untergrund der Analysenbahnen aus dem Untergrund probenfreier Bahnen rechts und links neben den Analysenbahnen bestimmt wurde.

Die Chromatogrammbahnen wurden bei einem Plattenvorschub von 6 mm/min und 1 Datenübergabe/4 sec mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 530 nm spaltförmig bestrahlt (Spaltbreite: 8 mm, Spaltdicke: 0,2 mm). Über das Anzeige-gerät und einen Integrator (Infotronics, Digital readout System, Modell CRS-104) wurden die Meßwerte auf eine Teletype übertragen; die Lochstreifen wurden am Großrechner der Philipps-Universität Marburg, entsprechend den Programmen für die KUBELKA-MUNK-Funktion von H. KUSSMAUL (1972), P. POST und S. EBEL (unveröffentlicht) ausgewertet.

Eine zweite Meßreihe wurde mit einem integrierenden Digitalvoltmeter (HEWLETT-PACKARD, Typ 3470) und einem Lochstreifenstanzer (HEWLETT-PACKARD, Typ 3489) bei einem Plattenvorschub von 60 mm/min und einer Datenfolge von 4 Daten/sec durchgeführt. Die Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes und die Spaltgrößen blieben unverändert.

β) -- Methode der Simultanmessung --

Die Simultanmessung wurde ebenfalls mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer PMQ II durchgeführt. Das Verhältnis Remission zu Transmission war bei $R : T = 2 : 1$ am günstigsten. Eingestrahlte Wellenlänge, Spaltbreite und -dicke sowie Chromatogramme blieben die gleichen wie bei der reinen Remissionsmessung. Für diese Methode wurden nur die Probenbahnen, nicht aber die Leerbahnen ausgemessen. Die Auswertung der Lochstreifen erfolgte über den HP-Rechner (HEWLETT-PACKARD, Typ 9830) nach den Programmen von P. POST (unveröffentlicht) .

C. Ergebnisse

I. Zellaufschluß und Extraktion der Lipide

K.HUNTER und A.H.ROSE (1971) empfehlen, bei Untersuchungen über den Fettgehalt von Hefen für jeden Stamm zunächst eine geeignete Aufschluß- und Extraktionsmethode zu entwickeln. Da *E. vernalis* und *T. utilis* bezüglich ihres Fettgehaltes bereits mehrfach untersucht worden waren, lagen für beide Organismen verschiedene Aufschlußverfahren vor, die geprüft und mit neuen Verfahren verglichen werden sollten.

P.S.S.DAWSON (1965) extrahierte die Zellen von *Torulopsis utilis* durch Übergießen mit einem siedenden Gemisch aus Chloroform/Isopropanol (1 : 1), ließ über Nacht stehen und perkolierte anschließend mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch. Die extrahierten Fettmengen waren sehr gering, was auf eine unvollständige Extraktion zurückzuführen sein könnte (J.S.HARRISON und W.F.TREVELYAN, 1963).

Die Methode von S.HEIDE (1939) ist langwierig und geht von einer einstündigen Inaktivierung der Enzyme bei 70°C im Vakuum (minimal 8-11 Torr) aus. Diese Behandlung lebender Zellen kann bis zur tatsächlichen Inaktivierung aller Enzyme (F.JUNGnickel, 1972) noch eine Veränderung in der Zusammensetzung der Lipide hervorrufen. Über die Änderung der Phospholipide während des Trocknens von Bäckerhefe wurde von J.S.HARRISON und W.F.TREVELYAN (1963) berichtet. Außerdem kann längeres Erwärmen von Lipiden in Gegenwart von Wasser zur Hydrolyse der Acylglycerine führen (M.LONCIN, 1953).

Der Zellaufschluß mit Ultraschall zur Extraktion der Lipide, der von B.WITTER (1972) zur Zerstörung der Zellen von *E. vernalis* angewendet wurde, ist sehr problematisch (s. dazu S. 23).

Zur Ermittlung eines effektiven Aufschlusses für die zwei Hefearten und eines geeigneten Extraktionsverfahrens für deren Neutrallipide und freien Fettsäuren wurden von uns drei Methoden getestet (s. S. 7 f), von denen die eine in Anlehnung an die Arbeit von S.HEIDE (1939) durchgeführt wurde.

Um die drei Verfahren zu erproben, wurden Submerskulturen verwendet, von deren Ernte gleich große Portionen zu je 2 ml Mycel aufgearbeitet wurden. Die Extraktion der Neutrallipide und der freien Fettsäuren wurde mit Petroläther in Soxhlet-Apparaturen durchgeführt (s.S. 7).

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der drei verschiedenen Aufschlußverfahren zusammengestellt worden.

Tabelle 1: Petrolätherlösliches von *E. vernalis* und *T. utilis* in Abhängigkeit vom Aufschlußverfahren.
Kulturbedingungen: Submerskulturen, Ernte nach 48 h; Nährlösung: 1/8 N-WÖLTJE-Lösung (*E. vernalis*) und 1/2N-WÖLTJE-Lösung (*T. utilis*).

	<i>E. vernalis</i>	<i>T. utilis</i>
Trockengew. von 2 ml Mycel	323 mg	391 mg
Aufschluß- verfahren	Petrolätherlösliches in mg (% vom Trockengew.)	Petrolätherlösliches in mg (% vom Trockengew.)
Gefriertrocknung/ Kieselgur-Ver- reibung	36 (11,1)	6,6 (1,7)
Kugelmühle	26 (8,1)	8,7 (2,2)
Ultraschall	23 (7,2)	5,9 (1,5)

Für *T. utilis* und *E. vernalis* erweisen sich nach Tab.1 verschiedene Verfahren des Zellaufschlusses als geeignet. Die größte Lipidmenge aus den Zellen von *T. utilis* wird nach dem Aufschluß mit der Kugelmühle extrahiert.

Für die Zellen von *E. vernalis* aber sind durch Gefriertrocknung und anschließendes Verreiben mit Kieselgur die besten Ergebnisse erzielt worden.

Eine mikroskopische Kontrolle des zerstörten Materials zeigte deutlich das verschiedene Verhalten der beiden Myceltypen gegenüber der Behandlung mit Ultraschall, Zelmühle oder Kieselgur.

Die Zellen bzw. das Mycel von *E. vernalis* sind in Größe und Form unterschiedlich, so daß nur das Verreiben mit Kieselgur zur mechanischen Zerstörung der meisten Zellen führte, wobei natürlich die langfädigen Mycelteile besonders leicht zerbrachen.

Die Zellen von *T. utilis* haben alle eine gleichmäßige, ovale Form, die schon aus rein mechanischen Gründen stabiler und deshalb schwerer aufschließbar sind. Der Zellaufschluß mit der Kugelmühle ergab einen besseren Zerstörungsgrad

$$(\text{ \% Zerstörung} = 100 - \frac{\text{intakte Zellen nach dem Aufschluß} \cdot 100}{\text{Gesamt-Zellen vor dem Aufschluß}})$$

als der Aufschluß mit Ultraschall. Das Mycel wurde hierbei 1 : 10 mit Wasser verdünnt und der Mahlbecher für die Behandlung mit der Kugelmühle mit Glasperlen vom Durchmesser 0,95 - 0,97 mm gefüllt. Nach 20 min Mahlen waren die Zellen zum größten Teil zerstört. Das mikroskopische Bild zeigte zumeist Zellen, die eine verletzte Wand hatten, oder etwa halbe Zellen. Bei der Behandlung mit Ultraschall waren die Partikelgrößen unterschiedlich, sie reichten von kleinsten Zellwandbruchstücken bis zu völlig unverletzten Zellen, die noch in beträchtlicher Anzahl vorhanden waren.

Um den Zerstörungsgrad klar zu beurteilen, wurden die Zellen von *T. utilis* vor und nach der Behandlung mit der Kugelmühle oder Ultraschall in einer Zählkammer gezählt. Dazu wurden 2,0 ml Mycel mit Wasser 1 : 100 verdünnt, ein Tropfen der Suspension wurde auf die Zählkammer gebracht und die intakten Zellen gezählt. Aus mindestens 20 Zählungen in je 1/4000 cmm wurde der Mittelwert gebildet und auf 1 cmm umgerechnet.

In Tabelle 2 (S.21) sind die Ergebnisse der Auszählungen zusammengefaßt.

Entsprechend der besseren Zerstörung der Zellen mittels der Kugelmühle wurde auch eine bessere Lipidextraktion erzielt (s. Tabelle 1, vgl. auch S. HEIDE, 1939, sowie J.S. HARRISON und W.E. TREVELYAN, 1963).

Tabelle 2: Zerstörungsgrad der Zellen von *T. utilis* in Abhängigkeit vom Aufschluß der Zellen.

Aufschluß- verfahren	Anzahl d. Zellen/cmm v.d. Aufschluß	Anzahl d.intakten Zellen/ cmm nach d. Aufschluß	Zerstörungsgrad = % Zerstörung
Kugelmühle	125 000	17 500	86
Ultraschall ohne Glas- perlen	125 000	100 000	20
Ultraschall mit Glas- perlen	125 000	40 000	68

Der Aufschluß mit Ultraschall oder mit der Kugelmühle erlaubte nach Zentrifugieren bei 2000 U/min eine Trennung in Zellinhalt und Protoplasamembrane einerseits und Zellwände andererseits, wobei die nicht zerstörten Zellen von den Zellwänden nicht getrennt wurden. Dadurch läßt sich eine ungefähre Aussage über die Verteilung der Lipide auf den Zellinhalt und die Zellwände machen.

Diese Verteilung der Lipide wurde am Beispiel von *T. utilis* näher untersucht. *E. vernalis* ist ja durch große Mengen an Reservelipiden im Plasma ausgezeichnet, wohingegen *T. utilis* wegen geringer Reservefettmengen ein eindeutigeres Verhältnis von im Plasma normalerweise vorhandenen Lipiden und den Lipiden im Zellwandmaterial erkennen läßt.

Für *E. vernalis* führt eine Auftrennung in Zellinhalt- und Zellwandfett auch deshalb nicht zu brauchbaren Werten, da die Zellzerstörung mit Kugelmühle und Ultraschall nicht erfolgreich genug war. Aus dem Grunde werden die Zellwandwerte zu stark durch nicht aufgeschlossene Zellen verfälscht.

Bei der schon in Tabelle 1 angeführten Kultur von *T. utilis* gliedert sich der Petrolätherextrakt folgendermaßen (s. Tabelle 3, S.22):

Tabelle 3: Verteilung des Petrolätherextraktes von *T. utilis* auf den Zellinhalt und die Zellwände.
Die in Klammern angegebenen Werte der Trockengewichte der Zellinhaltsfraktionen geben die jeweilige Differenz aus dem Trockengewicht der ganzen Zellen und dem der entsprechenden Zellwände an.
Kulturbedingungen: Submerskultur in 1/2 N-WÖLTJE-Lösung, Ernte nach 48 h.

Aufschluß- verfahren	Zellteile	Trockengew. in mg	Petroläther- extr. in mg	% Petrolätherextr. der	
				ganzen Zellen	Zell- teile
Gefriertrock- nung/Kieselgur- verreibung	ganze Zellen	391	6,6	1,69	-
Kugelmühle	Zellinhalt	(216)	6,0	1,54	(2,78)
	Zellwände	175	2,7	0,69	1,54
Ultraschall	Zellinhalt	(225)	4,1	1,05	(1,82)
	Zellwände	166	1,8	0,46	1,08

Die gründlicher aufgeschlossenen (zerstörten) Zellen (s. Spalte: Kugelmühle) lassen eine intensivere Fettextraktion sowohl der Zellinhalts- (6,0 mg) als auch der Zellwandfraktion (2,7 mg) gegenüber dem weniger vollständigen Aufschlußverfahren (s. Spalte: Ultraschall: im Vergleich 4,1 und 1,8 mg) erkennen. Offensichtlich werden nicht zerstörte Zellen gar nicht oder nur unvollständig mit Petroläther extrahiert.

Die Zellinhaltsfraktion enthält rund 2/3 des gesamten Petrolätherextraktes gegenüber rund 1/3 in der Zellwandfraktion. Bezieht man den Extrakt auf das Trockengewicht der entsprechenden Zellteile, so ist der Fettgehalt des Zellinhaltes etwa doppelt so groß wie der der Zellwände. Allerdings sei nochmals darauf hingewiesen, daß nach den Analysenergebnissen in Tabelle 2 beim Kugelmühlenaufschluß noch 14 % der Zellen unzerstört waren. Diese zusammen mit Zellinhaltsresten, die an den Zellwänden haften geblieben sind, dürften den Anteil des Fettes im Zellinhalt noch erhöhen und den der Zellwandfraktion erniedrigen.

Die Aufschlußverfahren sollten aber nicht nur hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit zur Zellerstörung und der damit verbundenen vollständigeren Extraktion der Lipide untersucht werden, sondern auch im Hinblick auf Artefakte, die möglicherweise durch den Aufschluß entstehen. Es ist z.B. bekannt, daß durch Einwirken von Ultraschall auf luft- oder sauerstoffhaltiges Wasser die Bildung von Wasserstoffperoxid induziert wird, daß hochpolymere Verbindungen wie Schleime und Proteine unter Verlust ihres Gelbildungsvermögens depolymerisiert werden und daß die Peroxid- und Jodzahlen sowie geringfügig die Säurezahlen der Fette durch die „oxydierende“ Wirkung des Ultraschalls (s.oben) erhöht werden (s. dazu E.NÜRNBERG, 1971). Als qualitatives Kriterium für die Brauchbarkeit der Zellaufschlußmethoden dienten die Säurezahlen der nach den verschiedenen Aufschlußverfahren gewonnenen Petrolätherextrakte, die bereits in Tabelle 3 angeführt sind (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Säurezahlen der Petrolätherextrakte von *T. utilis* in Abhängigkeit vom Aufschlußverfahren.
Kulturbedingungen: Submerskultur in 1/2 N-WÖLTJE-Lösung,
Ernte nach 48 h.

Aufschlußverfahren	Zellteile	SZ des Petrolätherextraktes
Gefriertrocknung	ganze Zellen	40
Kugelmühle	Zellinhalt	110
	Zellwände	27
Ultraschall	Zellinhalt	171
	Zellwände	39

Die Petrolätherextrakte der mit Ultraschall behandelten Zellen haben nach Tabelle 4 um 50 % höhere Säurezahlen (Zellinhaltsfraktion: 171, Zellwandfraktion: 39) als die Petrolätherextrakte der durch die Kugelmühle aufgeschlossenen Zellen (Zellinhaltsfraktion: 110, Zellwandfraktion: 27).

Unter Berücksichtigung, daß $\frac{2}{3}$ des Petrolätherlöslichen aus der Zellinhaltsfraktion stammen (s.S. 22), ergibt sich, daß der Petrolätherextrakt der gefriertrockneten und mit Kieselgur verriebenen Zellen mit einer Säurezahl von 40 noch unter der errechneten Säurezahl von 82 ($\frac{2 \cdot 110 + 1 \cdot 27}{3}$) des Petrolätherextraktes aus den gesamten Zellen nach Aufschluß mit der Kugelmühle liegt.

Diesen sehr großen Unterschieden in den Säurezahlen entsprachen halbquantitative Abschätzungen der Mengen an freien Fettsäuren und Triacylglycerinen in den einzelnen Petrolätherextrakten nach vergleichender Dünnschichtchromatographie. Der relativ größte Fleck an freien Fettsäuren und der relativ kleinste Fleck an Triacylglycerinen wurde bei der Zellinhaltsfraktion der mit Ultraschall behandelten Zellen gefunden.

Da beim Einwirken von Ultraschall auf Makromoleküle diese zerstört werden können (s. E.NÜRNBERG, 1971), ist nicht auszuschließen, daß ein Teil der freien Fettsäuren Bruchstücke aus Zellstrukturen, eventuell sogar aus Triacylglycerinen sind. Daraus ergibt sich bezüglich der Petrolätherextrakte ein falsches Bild über die tatsächlich in der Zelle vorhandenen Substanzen. Der Zellaufschluß mit Ultraschall ist also für Untersuchungen von Lipiden und auch anderen Verbindungsklassen mit großen Molekülen, z.B. Proteinen, ungeeignet, wenn diese als genuine Zellbestandteile erfaßt werden sollen.

Für den Zellaufschluß mit der Kugelmühle liegen keine Untersuchungen über eventuell auftretende Artefakte vor. Da jedoch auch hier die Gesamtsäurezahl des Petrolätherextraktes wesentlich höher lag als bei der Gefriertrocknungsmethode und weiterhin - ähnlich wie bei den mit Ultraschall behandelten Zellen - ein schnelleres Verderben besonders der Zellinhaltsfraktion beobachtet wurde, wurde in allen weiteren Untersuchungen der Lipidfraktionen für beide Versuchsorganismen nur der Zellaufschluß durch Verreiben mit Kieselgur nach vorangegangener Gefriertrocknung als nachweislich schonendste Aufschlußmethode angewendet.

II. Vorversuche für die quantitativen Bestimmungen durch Verkohlungs-DC und Messung der Remissionsminderung bzw. der Transmissionsminderung

M. L. BLANK u. Mitarb. (1964) führten quantitative Bestimmungen von Lipiden mit Hilfe eines Photovolt-Densitometers durch, der die Remissionsminderung über eine Photozelle mißt.

Für die Messung von Remissionsminderung und Transmissionsminderung stand uns dagegen das Spektralphotometer PMQ II (Fa. ZEISS, Oberkochen/Württ.) zur Verfügung, bei dem diese Messung über einen Photomultiplier durchgeführt wird.

Die quantitative Direktauswertung eines Analysenfleckes, der in einem geeigneten Wellenlängenbereich ein deutliches Absorptionsmaximum besitzt, wurde von H. KUSSMAUL (1972) für das Spektralphotometer PMQ II (verwendet als Ein- und simulierte Zweistrahlergerät) entwickelt. Diese Direktauswertung erfolgte über die KUBELKA-MUNK-Funktion

$$\frac{K}{S} = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2 R_{\infty}} = F(R_{\infty})$$

K = Absorptionskoeffizient; S = Streukoeffizient, R = ideale Remission einer unendlich dicken Schicht

(P. KUBELKA und F. MUNK, 1931).

Es galt, für die quantitative Bestimmung eines auf DC-Platten in mehrere Flecken aufgetrenntes Analysengemisch ein Programm zu entwickeln, das einerseits jeden auftretenden Fleck nach der KUBELKA-MUNK-Funktion vollständig bestimmte, das andererseits die registrierten Flecken richtig zuordnete. Es sollten also mit einer Testmischung aus den erwarteten Substanzen der Analyse auf einer Platte alle Komponenten bestimmt werden können ³⁾.

Schwierigkeiten zeigten sich darin, den trotz gleichmäßigen Besprühens immer etwas gescheckten Untergrund (vgl. S. 15) auszugleichen und bei den starken Konzentrationsunterschieden in den Analysengemischen auch die schwächsten Flecken noch zu erfassen.

Die Untersuchungsschwankungen konnten durch Simulierung eines Dreistrahlergerätes weitgehend ausgeglichen werden, denn durch Messen und Integrieren zweier Leerbahnen rechts und links neben der Analysenbahn wurde der Untergrund der Analysenbahn bestimmt (s.S. 16). Die Fleckerkennung blieb ein Problem des Auswertprogramms ⁴⁾.

3) und 4) s. Fußnote 2), S. 14

Als Vorversuche wurden Platten mit Testmischungen (Präparieren der Platten s. S. 15) auf Lochstreifen aufgenommen. Dabei wurde festgestellt, daß Fleckgröße und Intensität und damit die vom Anzeigergerät und Integrator bzw. Digitalvoltmeter bestimmte Fläche linear mit der aufgetragenen Menge zusammenhing.

In Tabelle 6 sind als Beispiel die Ergebnisse einer Bestimmung (Aufnahme des Lochstreifens über Infotronic Integrator und Teletype) aufgezeichnet, und zwar die Werte der Remissionsmessung (s. Experimenteller Teil, S. 16) mit Auswertung über den Großrechner und der Simultanmessung (s. Experimenteller Teil, S. 17) mit Auswertung über den HP-Rechner.

In die Messungen gingen folgende mögliche Fehler ein: Ungleichmäßige Platten, Fehler beim Auftragen der Eichlösungen (z.B. Fehler von Meßkolben, Pipetten, Auftragkapillaren), ungleichmäßiges Besprühen und die damit verbundene verschieden starke Verkohlung der Flecken, fehlerhafte Peakerkennung, sowie schlechte oder falsche Basislinienkorrektur.

Das oben angeführte Beispiel zeigt, daß die Auswertung über die Remissionsmessung zu besseren Korrelationskoeffizienten der Eichgeraden führte als die Auswertung über die Simultanmessung.

Der Korrelationskoeffizient
$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

ist ein Maß für die Güte der Eichgeraden. Eine Zusammenstellung der Korrelationskoeffizienten aller Eichgeraden, die aus vier Eichflecken vom Rechner aufgestellt wurden, ergab folgende Verteilung:

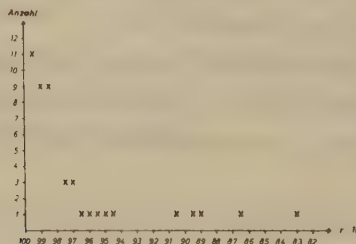


Abb.1: Verteilung der Korrelationskoeffizienten bei einer Intervallgröße von 0,005.

Fast 65 % aller Eichgeraden hatten also einen Korrelationskoeffizienten von über 0,9850. Eichgeraden mit schlechten Korrelationskoeffizienten wurden von Hand gezeichnet, um systematische Auftragfehler zu erkennen und zu eliminieren.

Tabelle 6: Aufgetragene Mengen, hRf-Werte, Flächen und Korrelationskoeffizienten der Eichgeraden von 1, 2-Dipalmitin, Ergosterin, Ölsäure/Palmitinsäure, Triolein/Tripalmitin und Cholesterinoleat bei Auswertung über Remissions- und Simultanmessung.

Substanzen	Remissionsmessung				Simultanmessung		
	aufgetragene Mengen in μg	hRf- Werte	Flächen nach Basislinien- korrektur	Korrelations- koeffizienten	rel. hRf- Werte	Flächen nach Basislinien- korrektur	Korrelations- koeffizienten
1, 2-Dipalmitin	6, 3 3, 15 1, 89 1, 26	42 43 43 43	2, 171 1, 586 1, 015 0, 5101	0, 9523	45	1, 8739 1, 2870 0, 8505 0, 4390	0, 9435
Ergosterin	13, 4 6, 7 4, 02 2, 68	59 61 62 63	12, 85 8, 64 5, 143 2, 581	0, 9719	63	6, 1997 4, 9240 3, 9864 2, 1450	0, 9241
Ölsäure/ Palmitinsäure	16, 7 8, 35 5, 01 3, 34	116 116 115 112	8, 731 5, 281 3, 446 2, 141	0, 9934	117	7, 7194 5, 0355 3, 4756 2, 2642	0, 9789
Triolein/ Tripalmitin	139, 7 69, 85 41, 91 27, 94	208 203 197 191	37, 89 22, 78 14, 73 9, 512	0, 9948	201	21, 7079 15, 9470 12, 2559 9, 1120	0, 9654
Cholesterin- oleat	10, 5 5, 25 3, 15 2, 1	294 289 289 292	5, 384 2, 482 1, 394 0, 9211	0, 9996	293	3, 2178 2, 3202 1, 2848 1, 0392	0, 9993

Bei der Durchführung der Analysen traten Programmschwierigkeiten auf, die im Rahmen einer vernünftigen Auswertungszeit nicht immer gelöst werden konnten. Und zwar wurden aufgrund des unregelmäßigen Plattenuntergrundes gelegentlich schwache Flecken nicht gefunden, die aber mit dem Auge aus der Aufzeichnung des Lochstreifens erkennbar waren. Trat ein solcher Fall bei den Eichmischungen ein, wurden die Flecken manchmal falsch zugeordnet und falsche Eichgeraden aufgestellt, was zur Folge hatte, daß die Endauswertung nicht zu sinnvollen Ergebnissen führte. In solchen Fällen wurden mit den vom Rechner gefundenen Flächen und den aufgetragenen Mengen Eichgeraden von Hand auf Millimeterpapier aufgestellt, gegebenenfalls auch aus nur drei Eichwerten. Beispiele, in denen die Rechenerauswertung vollständig war, zeigten, daß von Hand gezeichnete Eichgeraden zu gleichen Ergebnissen führten wie die Rechenerauswertung.

In den Abbildungen 2 bis 4 ist als Beispiel eine Analyse dargestellt: Die verkohlte Dünnschichtplatte und die Plotteraufzeichnungen der Remissions- und Simultanmessung.

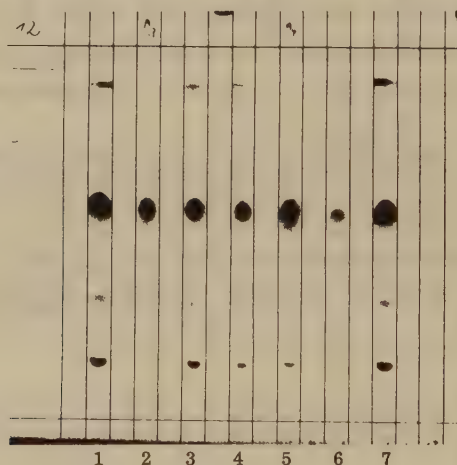


Abb. 2: Dünnschichtchromatogramm mit 5 Eichmischungen (Bahn 1, 3, 4, 6 und 7) und 2 Analysenmischungen (Bahn 2 und 5).

Fließmittel: 1. n-Hexan/Diäthyläther/Eisessig (80/20/1 ; v/v/v) ;

2. n-Hexan/Diäthyläther (95/4,5 ; v/v)

Sprühmittel: Gesättigte Lösung von Kaliumdichromat von 70 %iger wäßriger Schwefelsäure

Nachbehandlung: 25 min Erhitzen auf 180°C.

Die mit x bezeichneten Bahnen wurden nicht gemessen.

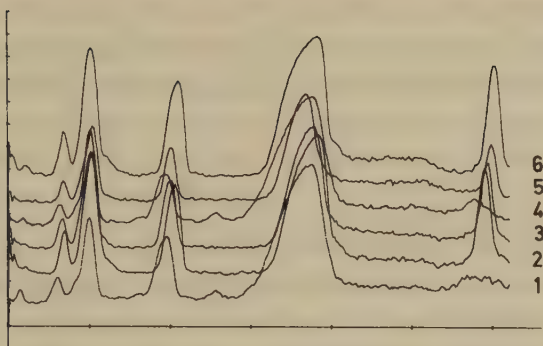


Abb. 3a: Simultanmessung; Remissions/Transmissionsgrad-Ortskurven beim Einlesen des Lochstreifens in den HP-Rechner. Bahn 1 und 4 sind Analysenbahnen, Bahn 2, 3, 5 und 6 sind Eichbahnen.

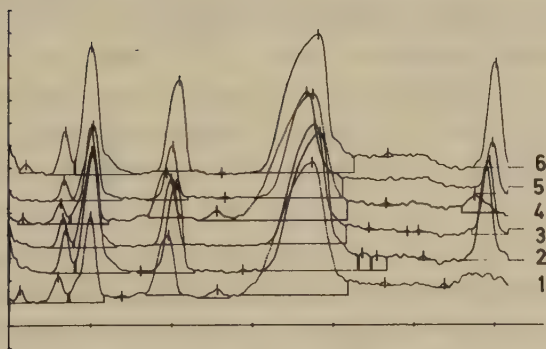
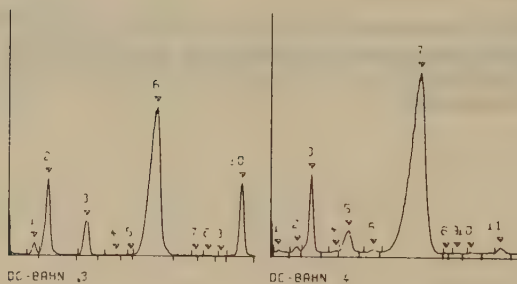
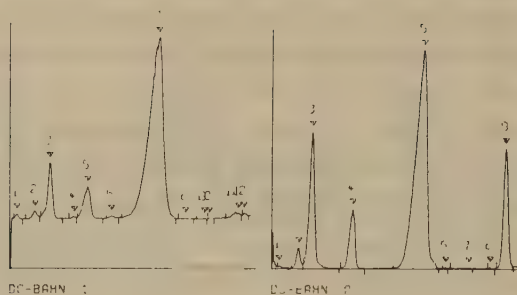


Abb. 3b: Simultanmessung; Remissions/Transmissionsgrad-Ortskurven bei der Peaksuchprozedur des HP-Rechners nach der Kurvenglättung. Die gefundenen Flecken sind durch Markierung des Peakmaximums und durch Einzeichnen der Basislinie gekennzeichnet. Bahn 1 und 4 sind Analysenbahnen, Bahn 2, 3, 5 und 6 sind Eichbahnen.

VEPK-DC 10



VEPK-DC 12

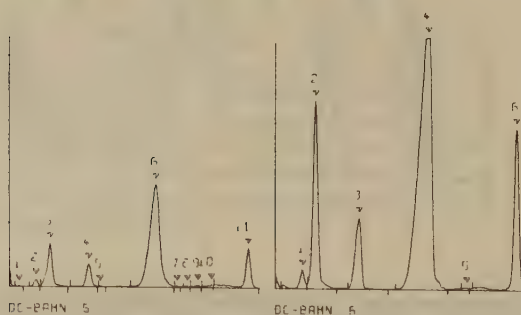


Abb. 4: Remissionsmessung; Remissionsgrad-Ortskurven der Auswertung durch den Großrechner. Die gefundenen Flecken sind durch Anfangs- (+) und Endzeichen (—), deren Maxima durch Pfeil (▽) und Nummer bezeichnet. Die Basislinienkorrektur ist nicht eingezeichnet. Bahn 1 und 4 sind Analysenbahnen, Bahn 2, 3, 5 und 6 sind Eichbahnen.

Aus den Abbildungen 3b und 4 ist ersichtlich, daß die Anzahl der gefundenen Flecken bei den beiden Auswertungsverfahren nicht immer die gleiche war, daß aber die Substanzflecken der Eichmischungen und die entsprechenden Analysenflecken gut erkannt wurden. In der Auswertung über die Remissionsmessung wurden in diesem Fall die Sterinester als Fleck (Fleck 11) in Analysenbahn 1 erkannt, in der Auswertung über die Simultanmessung nicht.

Im Tabellenanhang I (S.104 ff) ist eine Zusammenstellung aller Analysen mit den Ergebnissen für die einzelnen Lipidkomponenten aufgeführt. Daraus geht hervor, daß sowohl bei Remissionsmessung als auch bei Simultanmessung die Summe der gefundenen Werte in der Regel höher liegt als die aufgetragene Menge. Berechnet als Prozentsatz vom Gesamtpetrolätherextrakt liegen die Werte für die Remissionsmessung mit dem Infotronic Integrator und der Teletype zwischen rund 105 und 130. Der Mittelwert der Summen liegt bei 125,7, die Standardabweichung vom Mittelwert $\sigma_m = \sqrt{\frac{\sum(x^2) - \bar{x} \sum(x)}{N(N-1)}}$ betrug $\pm 3,05$.

Die Ergebnisse der Remissionsmessung mit dem integrierenden HP-Digitalvoltmeter und -Lochstreifenstanzer ergaben eine Standardabweichung vom Mittelwert (115,9) von $\pm 4,38$. Für die Simultanmessung lag die Standardabweichung vom Mittelwert (140) bei $\pm 5,77$. Daraus wird wiederum deutlich, daß die Bestimmung über die Remissionsmessung zu besseren Ergebnissen führt als die Simultanmessung, denn die Streuung der Ergebnisse war geringer und der Mittelwert lag niedriger. Deshalb wurden für die Auswertung der Ergebnisse nur die Meßwerte der Remissionsmessung zugrunde gelegt.

Die Beobachtung, daß in der Regel zuviel gefunden wurde, nämlich im Mittel 125 % bei der ersten Methode (Messung mit Hilfe des Infotronic Integrators und der Teletype) und 116 % bei der zweiten Methode (Messung mit Hilfe des HP-Digitalvoltmeters und -Lochstreifenstanzers) läßt sich folgendermaßen erklären:

Die Wahl der Vergleichssubstanzen war für die Bestimmung von natürlich vorkommenden Lipidmischungen schwierig, da nicht vorhergesagt werden konnte, welche Zusammensetzung die einzelnen Komponenten jeweils hatten.

Aus diesem Grunde konnte der Fall eintreten, daß für die Eichsubstanz ein anderer Verkohlungsgrad eintrat als für die entsprechende Substanz der natürlichen Lipidmischung (über unterschiedliche Verkohlungseigenschaften verschiedener Lipide siehe M.L.BLANK u.Mitarb., 1964; J.C.TOUCHSTONE, 1973).

Da in unserem Fall der Anteil der Triacylglycerine immer der größte war - bis auf wenige Ausnahmen betrug er über 80 % vom Gesamtpetrolätherextrakt - lag der größte absolute Fehler notwendig hier.

Wurden nach dem Verkohlen die Flecken der Triolein/Tripalmitin-Eichmischung bzw. des nur aus Triolein bestehenden Eichfleckes verglichen mit den Flecken der natürlich vorkommenden Triacylglycerine war deutlich zu beobachten, daß die Eichflecken eine etwas andere Form hatten als die Analysenflecken aus den Petrolätherextrakten der Hefen. Und zwar waren die letzteren in ihrer Fläche weiter ausge dehnt, teilweise mit geringerer Intensität und teilweise trotz zweifacher Entwicklung der Platten noch durch Schwanzbildung ausgezeichnet. Es erscheint nicht verwunderlich, daß gemischte Triacylglycerine und Mischungen davon sich beim Chromatographieren und beim Verkohlen etwas anders verhalten als reines Triolein oder eine Mischung aus Triolein und Tripalmitin, obgleich sich die Verkohlung von Triolein von der Verkohlung des Trilinolens nicht, und von der des Tripalmitins nur um 2 % unterscheiden (J.C.TOUCHSTONE, 1973; s.auch O.S.PRIVETT und M.L.BLANK, 1962). Entsprechendes gilt für die anderen Komponenten, kam aber hier nicht sehr zum Tragen, da diese nur in geringerer Menge auftraten. Eine Korrektur allein der Triacylglycerine führte wegen ihres hohen Anteils am Gesamtpetrolätherextrakt zu inhaltlich den gleichen Ergebnissen wie eine Korrektur aller Komponenten. Da erst durch weitere detaillierte Untersuchungen die Verteilung des Fehlers auf die einzelnen Lipidkomponenten festgestellt werden kann, wurde in dieser Arbeit eine gleichmäßige Korrektur aller Komponenten vorgenommen, so daß die gefundene Menge 100 % des Petrolätherextraktes nicht überschritt.

Die Vorversuche, mittels Verkohlungs-DC und anschließender Direktauswertung über Dünnschichtplatten für Lipid-Reihenuntersuchungen aus Hefen eine exakte quantitative Methode zu ermitteln, lassen sich im Ergebnis folgendermaßen zusammenfassen:

Die für die Bestimmungen aufgestellten Eichgeraden hatten Korrelationskoeffizienten, die zu 65 % über 0,985 lagen. Die Überbewertung der einzelnen Komponenten wurde durch Korrektur der gefundenen Gesamtmenge und damit aller Fraktionen berichtigt. Trotz der Überbewertung der Komponenten, die durch Ermittlung empirischer Korrekturfaktoren berichtigt werden kann, ist die Verkohlungs-DC eine geeignete Möglichkeit, die Bestandteile eines Lipidgemisches quantitativ zu bestimmen, besonders wenn eine größere Zahl von Gemischen ähnlicher Zusammensetzung in Reihenversuchen analysiert werden soll. Der Zeitaufwand zur Aufnahme des Lochstreifens mit dem HP-Digitalvoltmeter und -Lochstreifenstanzer (Aufnahmezeit: für 6 Substanzbahnen und 7 Leerbahnen insgesamt etwa 45 min) und zur Auswertung durch den Großrechner (Plotter-Ausgabezeit für 1 Lochstreifen: ca. 9 min , Auswertzeit für 1 Lochstreifen: ca. 7 min) ist gering. Damit führt diese Methode recht schnell zur quantitativen Erfassung verschiedener Stoffklassen eines natürlich vorkommenden Lipidgemisches aus beispielsweise Sterinen, freien Fettsäuren und verschiedenen Acylglycerinen.

III. Untersuchungen über die petrolätherlöslichen Lipide von *E. vernalis* und *T. utilis*

1. Lipidbildung in Abhängigkeit vom Alter der Kultur bei stickstoffreicher Ernährung

Nach S. HEIDE (1939) und H. RAAF (1941) ist auf Oberflächenkulturen gezogenes Mycel von *E. vernalis* bei stickstoffreicher Ernährung nach 4 Tagen noch in der logarithmischen Wachstumsphase, hat nach etwa 7 Tagen das Wachstumsmaximum erreicht und ist nach 12 Tagen in die Abbauphase eingetreten. Da mit zunehmendem Alter der Kultur der Fettgehalt steigt (M. STEINER und H. KATING, 1960), stellt sich die Frage, ob in diesem Zeitraum von starken Stoffwechselaktivitäten, besonders bezüglich des N-Stoffwechsels (G. DREPHAL, 1969), bis zum Stagnieren des Wachstums und dem beginnenden Abbau der Zellen qualitative und quantitative Unterschiede der gebildeten petrolätherlöslichen Lipide zu beobachten sind.

Die Eiweißhefe *T. utilis* unterscheidet sich von *E. vernalis* in dieser Beziehung dadurch, daß sie auch bei zunehmendem Alter kaum eine verstärkte Fettsynthese (M. STEINER und H. KATING, 1960) zeigt, so daß ein Vergleich bezüglich der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Lipide von sogenannten "Eiweißhefen" (*T. utilis*) und "Fettheften" (*E. vernalis*) zweckmäßig erscheint.

Versuchsansatz (1):

Die Versuchsorganismen wurden auf Oberflächenkulturen in 1/1N-WÖLTJE-Lösung gezogen und nach 4, 6 und 12 Tagen geerntet. Die Lipide wurden durch Petrolätherextraktion der gefriergetrockneten und mit Kieselgur verriebenen Zellen gewonnen. Die Petrolätherextrakte wurden hinsichtlich ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung analysiert; außerdem wurden die Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten untersucht.

a) Qualitative Untersuchung der Lipidkomponenten

In Abbildung 5 ist ein Chromatogramm der Petrolätherextrakte von 4, 6 und 12 Tage alten Kulturen von *E. vernalis* und entsprechenden Vergleichssubstanzen wiedergegeben.

Im UV-Licht erscheinen alle Flecken hellblau auf grünem Grund (s. S. 9). Die Flecken III und VI wurden nach Besprühen mit Naphthochinon-Sulfonsäure-Reagenz (E. STAHL, 1966) beim Erhitzen erst rosa, dann blau; mit Liebermann-Burchardt-Reagenz blau-violett. Der weitere Identitätsnachweis der Flecken wurde nach präparativer Dünnschichtchromatographie und Analyse der Einzelsubstanzen erbracht (s. Experimenteller Teil, S. 9 f).

Bei allen drei Kulturen wurden Sterinfettsäureester, Triacylglycerine, freie Fettsäuren, freie Sterine, Diacylglycerine und Spuren von Monoacylglycerinen gefunden. Damit wurden die Befunde von B. WITTER (1971) über die 6 Tage alten Kulturen von *E. vernalis* bestätigt, darüberhinaus konnten wir in allen Altersstufen der Kultur freie Fettsäuren und Spuren von Monoacylglycerinen nachweisen⁵⁾.

⁵⁾ Bei der Ernte des 12 Tage alten Mycels von *E. vernalis* fiel auf, daß sich diese Kultur durch eine deutliche Gelbfärbung der Pilzdecke auszeichnete. Nach der Extraktion der getrockneten Zellen waren diese weitgehend entfärbt, der Petrolätherextrakt jedoch deutlich intensiver gelb als die Petrolätherextrakte der 4 und 6 Tage alten Kulturen. Dieses Pigment erschien in dem oben angeführten Chromatogramm kaum.

- Zu 5) Es war aber deutlich bei der präparativen DC als eine bei Tageslicht sichtbare gelbe Zone in der Fließmittelfront zu sehen.
Eine Reaktion der dünnschichtchromatographisch abgetrennten Substanz mit konz. Schwefelsäure, ein UV-Spektrum der isolierten Substanz und das dünnschichtchromatographische Verhalten deuteten daraufhin, daß es sich bei diesem gelben Pigment um ein Carotinoid handelt.

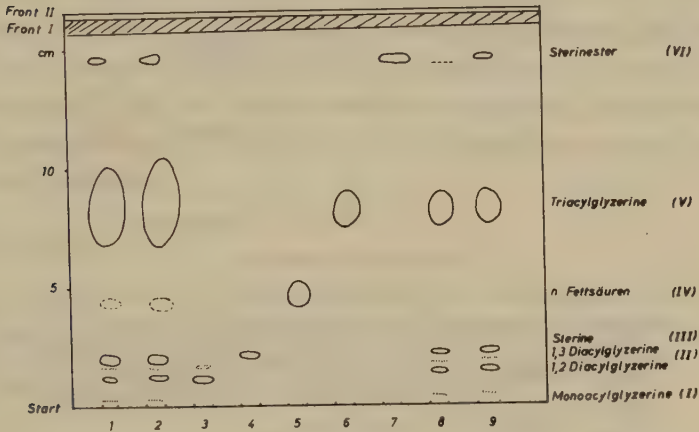


Abb. 5. Dünnschichtchromatogramm der Petrolätherextrakte von 4, 6 und 12 Tage alten Kulturen von *E. vernalis* (Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.). Schicht: Kieselgel G mit Pyranin; Fließmittel: 1. n-Hexan/Diäthyläther/Eisessig (80/20/1), 2. n-Hexan/Diäthyläther (95/5); Detektion: UV-Licht, 366 nm.

1. Petrolätherextrakt der 6 Tage alten Kultur. Auftragsmenge: ca. 300 µg
2. Petrolätherextrakt der 4 Tage alten Kultur. Auftragsmenge: ca. 300 µg
3. 1,2-Dipalmitin
4. Ergosterin
5. Ölsäure / Palmitinsäure
6. Triolein / Tripalmitin
7. Cholesterinoleat
8. Petrolätherextrakt der 4 Tage alten Kultur, Auftragsmenge: ca. 100 µg
9. Petrolätherextrakt der 12 Tage alten Kultur, Auftragsmenge: ca. 100 µg.

Die Analysen der Petrolätherextrakte von *T. utilis* (s. Abb. 6) zeigten qualitativ keine Unterschiede gegenüber den Komponenten der Lipide von *E. vernalis*.

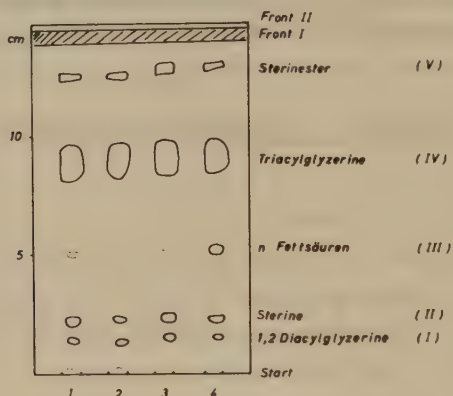


Abb. 6: Dünnschichtchromatogramm der Petrolätherextrakte von 4, 6 und 12 Tage alten Kulturen von *T. utilis* (Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung). Schicht: Kieselgel G mit Pyraninzusatz; Fließmittel: 1. n-Hexan/Diäthyläther/Eisessig (80/20/1; v/v/v), 2. n-Hexan/Diäthyläther (95/4,5; v/v); Detektion: UV-Licht, 366 nm.

1. Petrolätherextrakt der 4 Tage alten Kultur, Auftragsmenge: ca. 100 µg
2. Petrolätherextrakt der 6 Tage alten Kultur, Auftragsmenge: ca. 100 µg
3. Petrolätherextrakt der 12 Tage alten Kultur, Auftragsmenge: ca. 100 µg
4. Testmischung aus Cholesterinoleat (V), Triolein (IV), Ölsäure (III), Ergosterin (II) und 1,2-Dipalmitin (I).

Auch für diesen Organismus wurden Sterinfettsäureester, Triacylglycerine, freie Fettsäuren, Sterine, Diacylglycerine und Spuren von Monoacylglycerinen nachgewiesen.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Befunden von P.S.S. DAWSON (1970) über die "Neutrallipide" von *T. utilis* aus Synchronkulturen.

b) Trockengewichts- und Lipidproduktion sowie quantitative Untersuchungen der Lipidkomponenten

In Tabelle 7 (*E. vernalis*) und 8 (*T. utilis*) sind die Ergebnisse der Analysen der Trockensubstanz- und Lipidproduktion sowie die Mengen der einzelnen Lipidkomponenten in Abhängigkeit vom Alter der Kulturen zusammengefaßt. Die Angaben für Trockengewicht und Petrolätherlösliches sind Mittelwerte aus je drei Kulturschalen. Die Mengen- und Prozentangaben der Lipidkomponenten wurden von den Daten der quantitativen Verkohlungs-DC auf eine Kulturschale umgerechnet. Im Tabellenanhang I (s.S. 105) sind die Meßdaten der Verkohlungs-DC angeführt. In den Abbildungen 7a und 7b (*E. vernalis*) und 8 sind die Veränderungen im Kulturverlauf dargestellt.

α) *E. vernalis*

Tabelle 7: Trockensubstanz, Petrolätherlösliches und Lipidkomponenten von *E. vernalis* in Abhängigkeit von der Kulturdauer; Nährlösung: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung.
(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StF = Sterinfettsäureester)

Kulturdauer in h		96	144	288
Trockengew.		283	315	240
Petrolätherextr. in mg (% v. Trockengew.)		18,9 (6,7)	22,7 (7,2)	14,6 (6,1)
Lipidkomponenten (% v. Trockengew.)	DAG	1,3 (0,5)	1,8 (0,6)	0,6 (0,3)
	St	0,5 (0,2)	1,1 (0,4)	0,9 (0,4)
	Fs	0,5 (0,2)	1,0 (0,3)	Spur
	TAG	16,3 (5,8)	18,4 (5,8)	12,9 (5,4)
	StF	0,2 (0,07)	0,4 (0,1)	0,2 (0,08)

Aus Tabelle 7 ist ersichtlich, daß *E. vernalis* das Wachstumsmaximum nach 4 Kulturtagen noch nicht erreicht hat. Das Trockengewicht und der petrolätherlösliche Lipidgehalt steigen bei 144 h alten Kulturen gegenüber den 96 h alten um 32 mg (Trockengewicht) bzw. 3,8 mg (Petrolätherextrakt). Nach 288 h sind diese Komponenten deutlich geringer. Das Trockengewicht beträgt nur noch etwa 3/4 des Trockengewichtes der 144 h alten Kultur, das Petrolätherlösliche reduziert sich auf 2/3 des absoluten und 85 % des relativen Wertes. Bezogen auf die 96 h alte Kultur bedeutet dies einen Verlust des Trockengewichtes um 8,5 % und des petrolätherlöslichen Lipidgehaltes um 22 %.

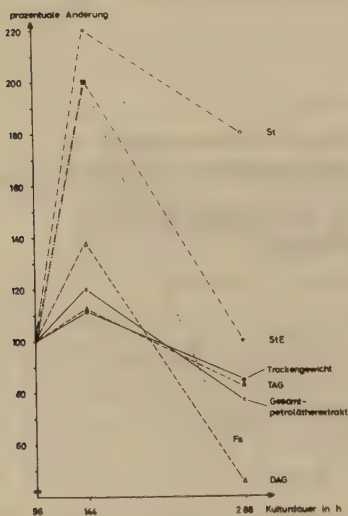


Abb. 7a:

Prozentuale Veränderungen von Trockengewicht, Petrolätherextrakt und Lipidkomponenten von *E. vernalis* bei 144 und 288 h alten Kulturen. Die Werte sind bezogen auf die 96 h alte Kultur (= 100 %). Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung.

(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

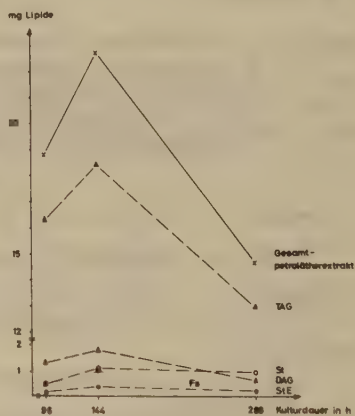


Abb. 7b:

Veränderungen des Petrolätherextraktes und der Lipidkomponenten von *E. vernalis* in Abhängigkeit vom Alter der Kultur.

Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung.

Die Zunahme der einzelnen Lipidkomponenten ist im Rahmen der Größenordnung ihres Vorkommens teilweise erheblich (s. dazu Abb.7a und Tab.7); so steigen z.B. der Gehalt der freien Fettsäuren, der Sterinester und der Sterine um rund das Doppelte bzw. um mehr als das Doppelte (Sterine). Der Anstieg der Triacylglycerine beträgt jedoch nur rund 13 % des Wertes der 96 h alten Kultur.

Betrachtet man jedoch die Zunahme der einzelnen Komponenten in Bezug auf den Gesamt-Lipidzuwachs, so wird dieser zu über 53 % von den Triacylglycerinen gebildet, die anderen Komponenten sind etwa gleich hoch an der Lipidzunahme beteiligt (Diacylglycerine und freie Fettsäuren rund 13 %, Sterine rund 15 %), der Anteil der Sterinester mit 5 % liegt am niedrigsten. Das heißt, die größte Zunahme an petrolätherlöslichen Bestandteilen wird nach 144 h Kulturdauer durch vermehrte Synthese der Triacylglycerine hervorgerufen, wenn auch die anderen Komponenten an der Zunahme merklich beteiligt sind (s.Abb.7b).

Bei fortschreitendem Alter der Kultur und der damit verbundenen Verminderung des Petrolätherlöslichen (s.S. 38) haben wiederum die Triacylglycerine bezogen auf die Lipidminderung den größten prozentualen Anteil (die Abnahme beträgt gegenüber dem Lipidverlust von 144 bis 288 h Kulturdauer rund 70 %, s.auch die Steigung der entsprechenden Geraden in Abb.7b). Bezogen auf die Absolutwerte der 96 h alten Kultur ist die prozentuale Minderung der Triacylglycerine gering (rund 18 % gegenüber dem prozentualen Rückgang von freien Fettsäuren und Diacylglycerinen, s. Abb. 7a). In beiden Darstellungen (Abb.7a und 7b) wird deutlich, daß der Anteil der Sterine und Sterinester, die nach 144 h Kulturdauer gegenüber der 96 h alten Kultur vermehrt auftraten, nach 288 h nicht unter den Wert der 96 h alten Kultur absinken, die freien Sterine behalten sogar einen höheren Wert (0,9 mg nach 288 h gegenüber 0,5 mg nach 96 h).

Die bei der qualitativen Analyse gefundenen Spuren von Monoacyl- und 1,3-Diacylglycerinen (s.S. 34) ließen sich bei der quantitativen Verkohlungs-DC nicht mehr erfassen (über das Vorkommen von 1,2- und 1,3-Diacylglycerinen bei Hefen s. auch A.H.ROSE und J.S.HARRISON, 1971).

β) T. utilis

Tabelle 8: Trockensubstanz, Petrolätherlösliches und Lipidkomponenten von T. utilis in Abhängigkeit von der Kulturdauer; Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung.

(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

Kulturdauer in h		96	144	288
Trockengew.		212	220	179
Petrolätherextrakt in mg (% v. Trockengew.)		9,0 (4,3)	9,3 (4,2)	7,0 (3,9)
Lipidkomponenten (% v. Trockengew.)	DAG	0,4 (0,2)	0,3 (0,1)	0,2 (0,1)
	St	0,6 (0,3)	0,3 (0,1)	0,4 (0,2)
	Fs	0,1 (0,05)	0,05 (0,02)	0,03 (0,02)
	TAG	7,4 (3,5)	8,3 (3,8)	5,8 (3,3)
	StE	0,5 (0,2)	0,4 (0,2)	0,6 (0,3)

Für T. utilis (Tabelle 8, Abbildung 8) ist das Wachstumsmaximum praktisch nach 96 h erreicht. Das Trockengewicht (Zunahme 4 %) und die petrolätherlöslichen Lipide (Zunahme 3 %) sind nach 144 h kaum verändert, danach setzt der Abbau der Zellsubstanz und der Lipide ein. Nach 288 h sind das Trockengewicht um 15 %, der Lipidgehalt um 22 % gegenüber der jungen Kultur gesunken (s. Abb.8).

Größere Unterschiede ließen sich bei den Lipidkomponenten beobachten; und zwar war die geringfügige Steigerung des Petrolätherlöslichen nach 144 h allein auf die Triacylglycerine (Zunahme 0,9 mg) beschränkt. Alle anderen Fraktionen lagen bereits nach 144 h in geringerer Menge vor als nach 96 h. Der Gehalt an freien Säuren und Acylglycerinen wurde mit zunehmendem Kulturalter geringer, die stärkste Abnahme war bei den Triacylglycerinen zu beobachten; der Anteil an Sterinen stieg wieder leicht an, die Sterinester erreichten nach 288 h einen gering höheren Wert als nach 96 h (0,6 mg gegenüber 0,5 mg nach 96 h).

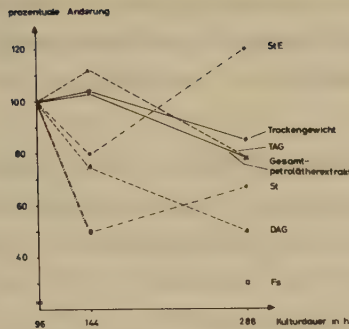


Abb. 8: Prozentuale Veränderungen von Trockengewicht, Petrolätherextrakt und Lipidkomponenten von *T. utilis* bei 144 und 288 h alten Kulturen. Die Werte sind bezogen auf die 96 h alte Kultur (= 100 %). Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung.

(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

In Abb. 8 zeigt sich, daß die prozentualen Schwankungen der einzelnen Lipidkomponenten von *T. utilis* geringer sind als die von *E. vernalis* (vgl. Abb. 7a).

Beim Altern der Kulturen von *E. vernalis* und *T. utilis* werden von den petrolätherlöslichen Lipiden zuerst die Acylglycerine, besonders die Triacylglycerine abgebaut. Die Sterine und Sterinester zeigen in dem untersuchten Kulturzeitraum bei den Versuchsorganismen ein unterschiedliches Bild. Bei *E. vernalis* steigt der Gehalt beider Komponenten bis zu 144 h an, danach ist eine geringe Abnahme zu beobachten. Bei *T. utilis* hingegen tritt nach anfänglichem Abbau in der alternenden Kultur eine Neusynthese dieser Komponenten ein, wobei der Gehalt der Sterinester den Wert der 96 h alten Kultur übersteigt. *T. utilis* zeigt in allen Kulturen gegenüber *E. vernalis* einen höheren absoluten und auch - auf das Trockengewicht bezogen - höheren relativen Gehalt an Sterinestern.

c) Analyse der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten

Zur weiteren Charakterisierung der petrolätherlöslichen Lipide wurden die Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten untersucht. Hierdurch sollte festgestellt werden, ob sich die Fettsäuren von *E. vernalis* und *T. utilis* unterscheiden und ob sich jeweils in den verschieden alten Kulturen der beiden Organismen bezüglich der Fettsäuren Veränderungen beobachten lassen.

Aus den dünn-schichtchromatographisch getrennten Lipidfraktionen wurden durch Umesterung oder direkte Methylierung die Fettsäuremethylester (FsME) gewonnen (s. Experimenteller Teil, S. 9 und S. 10) und gaschromatographisch analysiert.

Die qualitative Analyse der FsME führte für beide Organismen in allen Fraktionen und nach allen untersuchten Kulturzeiten zum gleichen Fettsäuremuster. In Abb. 9 a-e und 10 a-d sind als repräsentative Beispiele die Fraktogramme der FsME der Lipidkomponenten der 96 h alten Kultur von *E. vernalis* (Abb. 9 a-e) und *T. utilis* (Abb. 10 a-d) wiedergegeben.

Fs wurden überall die gesättigten Fettsäuren Laurinsäure (1), Myristinsäure (3), Pentadecansäure (5), Palmitinsäure (7), Heptadecansäure (9) und Stearinsäure (11) als ME nachgewiesen. Die Fettsäuren mit gleicher C-Zahl kamen in allen Fraktionen auch mit einer Doppelbindung vor (Abb. 9 a-e und 10 a-d: gerade Peak-Nr.), außerdem die höher ungesättigten Fettsäuren Linol- (13) und Linolensäure (14).

Die Hauptkomponenten waren für beide Organismen Ölsäure, Linolsäure und Palmitinsäure. *E. vernalis* zeichnete sich außerdem durch deutliche Mengen an Stearinsäure aus, *T. utilis* durch größere Mengen an Palmitoleinsäure, in den abgebildeten Fraktogrammen zusätzlich durch größere Anteile an Linolensäure (Abb. 10 a-c).

Wegen der außerordentlich geringen Mengen der kürzerkettigen Fettsäuren (C-Zahl kleiner als 16) konnten teilweise die entsprechenden FsME der Fettsäuren mit einer Doppelbindung gaschromatographisch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Da aber gelegentlich Peaks bei den entsprechenden Retentionszeiten auftraten, müßte mit einer Spurenanalyse der FsME der jeweiligen Fettfraktionen ein eindeutiger Beweis über das Vorkommen dieser Fettsäuren durchführbar sein. Als Erhärtung für die Annahme, daß es sich um die oben erwähnten FsME handelt, diente uns neben verschiedenen gaschromatographischen Analysenverfahren (s. Experimenteller Teil, S. 13) die halblogarithmische Darstellung von Gesamtretentionszeit und C-Zahl, bei der Verbindungen einer homologen Reihe bei isothermer Arbeitsweise auf einer Geraden liegen. Als Bezugsverbindungen wurden die Retentionszeiten von Palmitolein- und Ölsäure genommen, die sicher nachgewiesen wurden (s. Experimenteller Teil, S. 13).

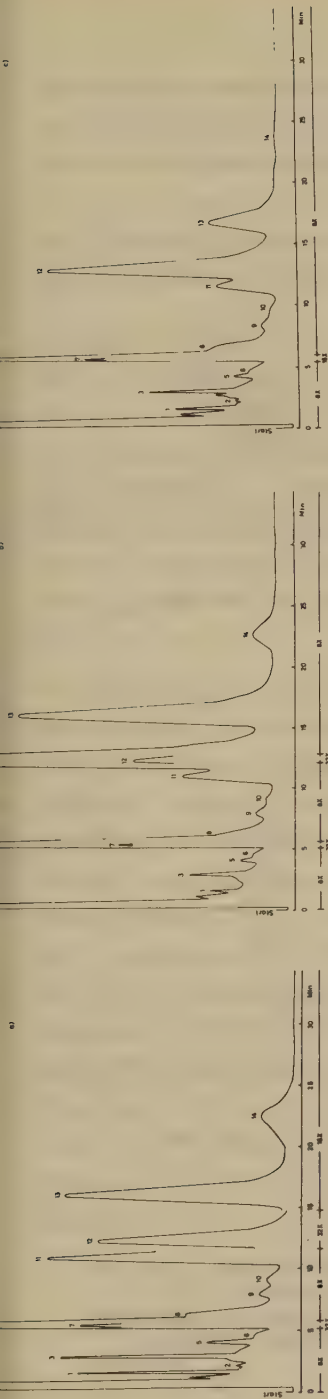


Abb. 9a

Abb. 9b

Abb. 9c

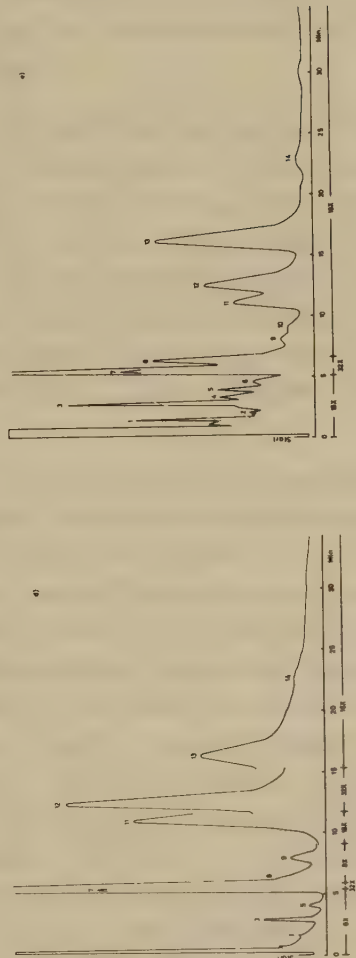


Abb. 9d

Abb. 9e

Abb. 9 a-e:

Fraktogramme der FsME der Lipidkomponenten von *F. vernalis*; Nährmedium: 1/1N-WÖLTJE-Lsg.; Kulturdauer: 96 h.
a) FsME der freien Fettsäuren, b) FsME der 1,2-Diacylglycerine, c) FsME der 1,3-Diacylglycerine, d) FsME der Triacylglycerine, e) FsME der Sterinester.

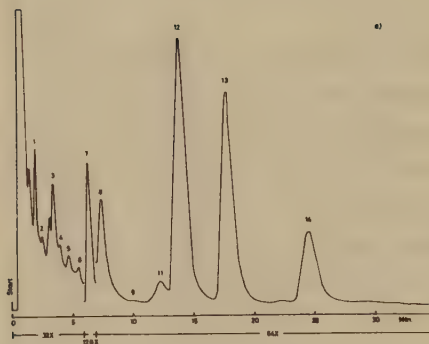


Abb. 10a

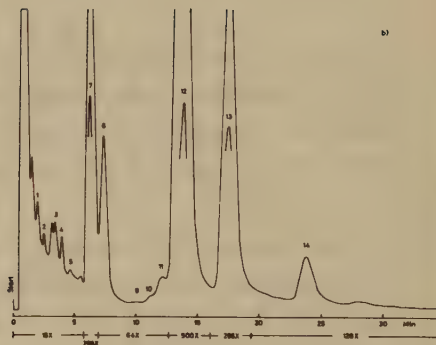


Abb. 10b

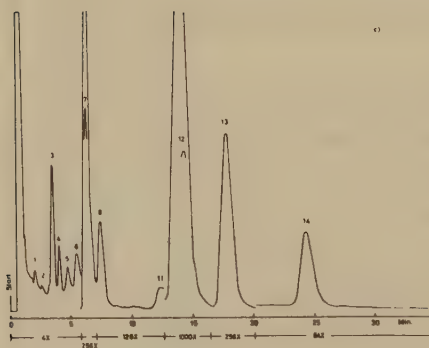


Abb. 10c

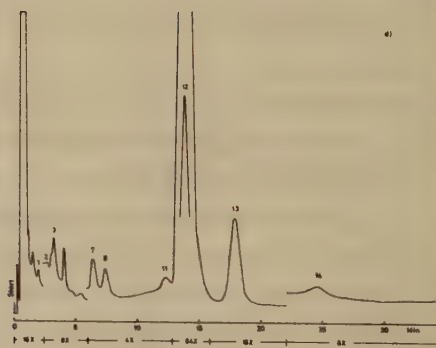


Abb. 10d

Abb.10 a-d: Fraktogramme der FsME der Lipidkomponenten von *T. utilis*;
Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.; Kulturdauer: 96 h.
a) FsME der freien Fettsäuren, b) FsME der Diacylglycerine,
c) FsME der Triacylglycerine, d) FsME der Sterinester.

Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde von B.WITTER (1972), P.S.S.DAWSON und B.M. CRAIG (1966) und B.KLOT u.Mitarb., (1969) bezüglich des Vorkommens der gesättigten Fettsäuren ab C_{14} und der ungesättigten Fettsäuren ab C_{16} bei *E. vernalis* und *T. utilis*. Darüberhinaus sind nach unseren Untersuchungen auch Laurinsäure und die Fettsäuren mit einer Doppelbindung bereits ab C_{12} im Fettsäuremuster dieser Organismen enthalten.

In den Abb. 9 a-e und 10 a-d wird bereits deutlich, daß die quantitative Zusammensetzung der Fettsäuren in den einzelnen Lipidkomponenten der Petrolätherextrakte von *E. vernalis* und *T. utilis* offensichtlich nicht die gleiche ist. Die quantitative Auswertung der Gaschromatogramme zeigte für beide Organismen Unterschiede in der Verteilung der Fettsäuren, sowohl in den verschiedenen Fraktionen einer Kultur, als auch in den entsprechenden Komponenten in der Kulturreihe. Als repräsentatives Beispiel sei die quantitative Verteilung der Fettsäuren in den einzelnen Lipidkomponenten der 96 h alten Kultur von *E. vernalis* in Tabelle 9 wiedergegeben (s.S. 46).

In Tabelle 9 kommt zum Ausdruck, daß die charakteristischen Unterschiede der Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Lipidkomponenten in den Mengenverhältnissen zweier Hauptkomponenten, der Ölsäure und der Linolsäure zu sehen sind. Es fällt auf, daß bei den Acylglycerinen eindeutig Ölsäure den größten prozentualen Anteil bildet, bei den Sterinestern jedoch Linolsäure (32 % gegenüber 14 % Ölsäure). Bei den frei vorkommenden Fettsäuren ist aber kein nennenswerter Unterschied der Mengen an Ölsäure (36%) und Linolsäure (30%) besonders hervorzuheben. Die dritte Hauptkomponente, Palmitinsäure, zeigt keine wesentlichen Unterschiede in den einzelnen Lipidfraktionen (20-28 %). Bemerkenswert ist weiterhin das Auftreten von fast 9 % Palmitoleinsäure in der Fraktion der Sterinester gegenüber weniger als 1 % in den anderen Fraktionen.

Im weiteren Kulturverlauf (144 h alte Kultur , s. Tabellenanhang II, Tabelle 2 , S. 109) zeigt sich zunächst in allen Fraktionen - außer der Fraktion der freien Fettsäuren - eine Zunahme der Ölsäure auf Kosten der Palmitinsäure (Rückgang auf weniger als 20 %) und der Stearinsäure.

Tabelle 9: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren von *E. vernalis* in den einzelnen Lipidkomponenten. Die Werte sind Prozente des Gesamtfettsäuregehaltes jeweils einer Lipidfraktion (= 100 %). Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung; Kulturdauer: 96 h.

(DAG = Diacylglycerine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1,2-DAG	1,3-DAG	freie FS	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,27	0,2	1,2	0,7	0,1	1,3
C ₁₂₌₁	0,38	-	0,2	0,1	-	0,2
C ₁₄₌₀	0,51	1,1	3,9	1,6	0,8	6,5
C ₁₄₌₁	0,62	-	-	-	-	1
C ₁₅₌₀	0,73	0,4	1,2	0,5	0,3	2,2
C ₁₅₌₁	0,85	0,1	0,3	0,1	-	1,3
C ₁₆₌₀	1,00	20,3	28,2	20,2	22,8	22,6
C ₁₆₌₁	1,17	< 0,1	0,7	0,7	0,1	8,6
C ₁₇₌₀	1,46	0,5	0,7	0,6	1,2	0,9
C ₁₇₌₁	1,66	0,3	0,4	0,4	0,6	0,6
C ₁₈₌₀	2,02	6,0	9,1	4,2	5,0	7,9
C ₁₈₌₁	2,28	43,4	39,2	36,3	53,3	14,2
C ₁₈₌₂	2,95	24,9	14,1	30,4	13,7	31,9
C ₁₈₌₃	3,99	2,9	0,6	4,2	1,3	1,6

Die Stearinsäure tritt bei den freien Fettsäuren erheblich verstärkt auf (18 %), was mit einem um rund 20 % verminderten Vorkommen der Linolsäure verknüpft ist. Nach 288 h Kulturdauer (s. Tabellenanhang II, Tabelle 3 , S. 109) läßt sich ausnahmslos ein erhöhter Anteil an Linolsäure (bis 55 % bei den Sterinestern) beobachten, der durch Einbußen an Ölsäure und außer bei den freien Fettsäuren durch Einbußen an Palmitinsäure zustandekommt. Eine detaillierte Beschreibung der Mengen der einzelnen kürzerkettigen Fettsäuren soll hier nicht vorgenommen werden, da diese entsprechend der Fettsäuresynthese und dem Fettsäureabbau keine Endstadien darstellen und das mehr oder weniger starke Auftreten der einzelnen Säuren Zufallsergebnisse sein können.

Nur die Gesamtheit der kürzerkettigen Fettsäuren läßt eine gewisse Aussage über den allgemeinen Entwicklungszustand der Fettsynthese in der Kulturreihe zu.

So geben die nach der Kettenlänge zusammengefaßten Fettsäuren (s. Tabelle 10) ein klares Bild darüber, daß mit zunehmendem Kulturalter in fast allen Fraktionen der Anteil der C_{18} -Fettsäuren steigt, während der der C_{16} -Säuren fällt. Bei den Diacylglycerinen und den Sterinestern sinkt außerdem mit zunehmendem Kulturalter der Anteil der Fettsäuren mit weniger als 16 C-Atomen. Die freien Fettsäuren zeigen im Kulturverlauf nahezu unveränderte Mengen an C_{16} - und C_{18} -Säuren. Die Sterinester zeichnen sich weiterhin in allen drei Kulturen dadurch aus, daß sie im Vergleich mit den anderen Fraktionen stets den geringsten Anteil an C_{18} -Fettsäuren haben und den größten (oder mit den freien Fettsäuren gleichgroßen) Anteil an kürzerkettigen Fettsäuren.

Tabelle 10: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren mit weniger als 16, mit 16 und mit 18 C-Atomen von *F. vernalis* in den einzelnen Lipidkomponenten in Abhängigkeit vom Alter der Kultur. Die Werte sind Prozente des Gesamtfettsäuregehaltes jeweils einer Lipidfraktion (=100 %).
Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung.

(DAG = Diacylglycerine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

Fettsäuren	$C_{<16}$			C_{16}			C_{18}		
Kulturdauer in h	96	144	288	96	144	288	96	144	288
1, 2-DAG	1,8	1,6	0,8	20,3	18,5	12,2	77,2	78,3	84,8
1, 3-DAG	6,8			28,9			63,0		
Fs	2,9	6,6	5,6	20,9	25,6	25,5	75,1	74,8	75,7
TAG	1,1	0,6	0,9	22,9	19,1	14,4	74,1	78,9	82,2
StE	12,5	6,3	5,9	31,2	20,5	15,5	55,6	67,7	76,4

Charakteristisch für die alternde Kultur von *E. vernalis* ist also eine Zunahme der C_{18} -Säuren auf Kosten der kürzerkettigen Fettsäuren und der C_{16} -Säuren und weiterhin der Anstieg der prozentualen Anteile an höher ungesättigten Fettsäuren, besonders der Linolsäure, in geringerem Maße aber auch der Linolensäure.

Die quantitative Zusammensetzung der Fettsäuren in den einzelnen Lipidfraktionen der 96 h alten Kultur von *T. utilis* (s. Tab. 11) unterscheidet sich in einigen Punkten wesentlich von dem Fettsäurespiegel der entsprechenden Kultur von *E. vernalis* (s. Tab. 9).

Tabelle 11: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren von *T. utilis* in den einzelnen Lipidkomponenten. Die Werte sind Prozente des Gesamtfettsäuregehaltes jeweils einer Lipidfraktion (= 100 %). Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung; Kulturdauer: 96 h.

(DAG = Diacylglycerine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	DAG	Fs	TAG	StE
$C_{12=0}$	0,32	0,1	0,7	0,1	0,1
$C_{12=1}$	0,42	0,1	0,1	0,1	0,1
	0,52	0,1	0,4	0,1	0,4
$C_{14=0}$	0,55	0,1	1,1	0,1	0,1
$C_{14=1}$	0,64	0,1	0,2	0,1	0,6
$C_{15=0}$	0,76	0,1	0,3	0,1	0,1
$C_{15=1}$	0,89	0,1	0,3	0,1	0,1
$C_{16=0}$	1,00	12,1	14,5	8,8	0,4
$C_{16=1}$	1,19	2,3	4,8	2,0	0,3
$C_{17=0}$	1,42	0,1	0,1	0,1	0,1
$C_{17=1}$	1,65	0,1	0,2	0,1	0,1
$C_{18=0}$	1,99	0,5	2,1	0,4	0,2
$C_{18=1}$	2,23	51,9	30,2	63,9	86,0
$C_{18=2}$	2,86	28,1	30,4	21,6	10,7
$C_{18=3}$	3,94	4,8	14,4	3,1	0,6

Zunächst fällt auf, daß in allen Fraktionen der Anteil der kürzerkettigen Fettsäuren wesentlich geringer ist als bei *E. vernalis*. Bei den Acylglycerinen liegt er insgesamt unter 1%, bei den Sterinestern um 1% und bei den freien Fettsäuren sind rund 3% vorhanden. Die Hauptkomponenten der Acylglycerine sind wie bei *E. vernalis* Ölsäure, Linolsäure und Palmitinsäure, die freien Fettsäuren sind zusätzlich durch größere Mengen Linolsäure (rund 14%) gekennzeichnet. Die Fettsäuren der Sterinester sind durch das Vorkommen von zwei Fettsäuren charakterisiert, der Ölsäure (86%) und der Linolsäure (10,7%); alle anderen Fettsäuren, auch die Palmitinsäure, kommen nur in Spuren vor (vgl. dagegen das verstärkte Auftreten kürzerkettiger Fettsäuren und der Palmitoleinsäure bei den Sterinestern von *E. vernalis*).

Mit fortschreitender Kulturdauer wird zunächst (nach 144 h Kulturdauer) eine starke Vermehrung des Anteils an Palmitinsäure in der Fraktion der freien Fettsäuren beobachtet (von rund 15% auf 30% nach 144 h Kulturdauer; s. Tabellenanhang II, Tabelle 28, S. 122), außerdem ein Ansteigen der Mengen an kürzerkettigen Fettsäuren (von insgesamt 3% auf 14%), der Palmitolein- und der Stearinsäure. Die Zunahme dieser Fettsäuren erfolgte auf Kosten der Linol- und Linolensäure (Rückgang von 30% auf 10%, bzw. von 14% auf unter 1%). Bei den Fettsäuren der Sterinester zeichnet sich bereits nach 144 h Kulturdauer eine Zunahme der höher ungesättigten Fettsäuren, besonders der Linolsäure ab, eine Entwicklung im Fettsäurespiegel, die nach 288 h auch bei den anderen Fraktionen als deutliche Tendenz zu beobachten ist. Bei den freien Fettsäuren steigt außerdem der Anteil der Palmitoleinsäure weiter an (nach 144 h: 7,9%, nach 288 h: 10%). Die Zunahme der Linol- und Linolensäure ist in allen Fraktionen mit einer Verminderung des Palmitinsäureanteils und des Ölsäureanteils verbunden.

Die Tendenz, daß bei älteren Kulturen der Anteil an Fettsäuren mit 18 C-Atomen zunimmt und die Anzahl der Doppelbindungen in diesen Fettsäuren steigt, war auch bei *E. vernalis* beobachtet worden.

Als besonderes Charakteristikum für *E. vernalis* gegenüber *T. utilis* kann herausgestellt werden, daß die Summe der C_{16} - und der C_{18} -Fettsäuren sich bei den frei vorkommenden Fettsäuren in alternden Kulturen nicht wesentlich ändert.

Dieses Ergebnis unterstützt die Befunde von K.BLOCH u.Mitarb. (1961), entsprechend deren Untersuchungen die Bildung ungesättigter Fettsäuren bei Hefen durch nachträglichen Einbau der Doppelbindungen in die Fettsäuren erfolgt. Die Entstehung von Linol- und Linolensäure aus Ölsäure ist für *T.utilis* als ein Oxidationsvorgang, der molekularen Sauerstoff erfordert, beschrieben worden (K.BLOCH u.Mitarb., 1961; C.YUAN und K.BLOCH, 1961). Bei gealterten Oberflächenkulturen ist der Luftaustausch über einen längeren Zeitraum gewährleistet, so daß die Bildung von Linol- und Linolensäure erfolgen kann. Da *E.vernalis* in gleicher Weise wie *T.utilis* mit zunehmendem Alter einen höheren Anteil an Linol- und Linolensäure aufweist, ist anzunehmen, daß auch dieser Organismus einen oxidativen Syntheseweg für die höher ungesättigten Fettsäuren einschlägt.

2) Einfluß der Wachstoffsstoffe Biotin und Aneurin auf die Lipidbildung von *E.vernalis* und *T.utilis*

L.casei, verschiedene Stämme von *S.cerevisiae*, *S.carlsbergensis*, Brauereihefe u.a.m. benötigen zum Wachstum Biotin bei der Kultivierung auf vollsynthetischen Nährmedien (R.J.WILLIAMS u.Mitarb., 1940; R.H.LEONIAN und K.G.LILLY, 1942; L.ATKIN u.Mitarb., 1949a; F.WEINFURTNER u.Mitarb., 1959). *T.utilis* und *Hansenula anomala* nehmen aus der Nährlösung kein Biotin auf (W.-S.CHANG und W.H.PETERSON, 1949). A.J.A.KERÄNEN (1969) hingegen zeigte für *T.utilis*, daß im Nährmedium vorhandenes Biotin die Eigensynthese des Biotins in dieser Futterhefe auslöste. Für eine *Endomycopsis spec.* liegen Untersuchungen über den Biotinabbau und die Bildung von Biotinderivaten (Biotinsulfoxid, Bisorbiotin, Bisorbiotinsulfoxid) vor (H.-C.YANG u. Mitarb., 1970). Da Biotin als Bestandteil der Acetyl-CoA-Carboxylase direkt an der Biosynthese der Lipide beteiligt ist, stellt sich die Frage, ob bei Zusatz von Biotin zum Nährmedium die Art und Menge der gebildeten Lipide verschieden gegenüber der biotinfreien Kultur ist.

Für Lactose assimilierende Hefen und *Rhodotorula*-Arten ist Aneurin unentbehrlicher Wachstoffsstoff (D.G.AHEARN u.Mitarb., 1962; D.W.R.MACKENZIE und B.J.AURET, 1963).

Das Wachstum von *S. cerevisiae* wird durch Aneurin stark angeregt (R.J. WILLIAMS u. Mitarb., 1940; R.H. LEONIAN und K.G. LILLY, 1942). H.H. MARTIN (1954) fand für *C. reukaufii* eine maximale Fettproduktion bei Zusatz von Biotin und Aneurin. Deshalb sollte weiter untersucht werden, ob auch Aneurin bei *E. vernalis* und *T. utilis* einen Einfluß auf die Fettsynthese habe.

Versuchsansatz (2):

Die Versuchsorganismen wurden auf 1/1 N-WÖLTJE-Lösung gezogen, die zusätzlich a) 13 μ g Biotin/Ltr.; b) 13 μ g Biotin und 50 μ g Aneurin/Ltr. enthielt, und nach 96 und 144 h geerntet. Die Lipide wurden nach der Gefriertrocknungsmethode gewonnen (s.S. 7) und qualitativ und quantitativ untersucht; weiterhin wurden die Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten analysiert.

Die qualitativsten Untersuchungen der Petrolätherextrakte beider Organismen führten bei Gaben von Biotin und Aneurin zu dem gleichen Ergebnis wie die Kulturen ohne Vitaminzusatz. In quantitativer Hinsicht sind jedoch Unterschiede sowohl im Wachstum (*T. utilis*) als auch in der Lipidsynthese (*E. vernalis* und *T. utilis*) zu beobachten.

a) Trockengewichts- und Lipidproduktion sowie quantitative Untersuchungen der Lipidkomponenten

Die Ergebnisse bezüglich des Wachstums, der Menge an petrolätherlöslichen Lipiden und der Verteilung der einzelnen Lipidkomponenten sind in Tabelle 12 (*E. vernalis*) und Tabelle 13 (*T. utilis*) zusammengefaßt.

Der Zusatz von Biotin zum Nährmedium wirkte sich bei *E. vernalis* nur sehr wenig auf die Substanzproduktion aus (Zunahme rund 2%), dagegen trat eine erhebliche Vermehrung der petrolätherlöslichen Lipide (Zunahme 40%) gegenüber der vitaminfreien Kontrollkultur ein (s. Tabelle 12). Wurde der Nährlösung außer Biotin noch Aneurin zugefügt, dann erhöhte sich das Trockengewicht um über 10%, bei einer gleichzeitigen Steigerung der petrolätherlöslichen Lipide um rund 73% gegenüber der Kultur ohne Vitaminzusatz.

Tabelle 12: Trockengewicht, Petrolätherlösliches und Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung mit Zusatz von 13 µg Biotin (1/1 N + B) / Ltr. und 13 µg Biotin und 50 µg Aneurin/Ltr. (1/1 N + B + A); Kulturdauer: 96 und 144 h.

(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

Kulturdauer in h		96	96	144	96
WÖLTJE-Lsg.		1/1 N	1/1 N + B	1/1 N + B	1/1 N + B + A
Trockengew. in mg		224	229	266	259
Petrolätherextr. in mg (% vom Trockengewicht		13,9 (6,2)	19,6 (8,6)	26,9 (10,1)	24,1 (9,3)
Lipidkomponenten (% v. Trockengew.)	DAG	1,0 (0,4)	0,5 (0,2)	0,6 (0,2)	0,3 (0,1)
	St	0,4 (0,2)	0,6 (0,3)	0,5 (0,2)	1,0 (0,4)
	Fs	0,4 (0,2)	0,05 (0,02)	0,6 (0,2)	0,02 (0,008)
	TAG	12,0 (5,4)	18,1 (7,9)	24,5 (9,2)	22,3 (8,6)
	StE	0,1 (0,04)	0,4 (0,2)	0,6 (0,2)	0,4 (0,2)

Die Zunahme des Petrolätherlöslichen wurde in beiden Kulturen durch eine stark erhöhte Triacylglycerinsynthese (+ 5,9 mg bei Biotinzusatz; + 10,3 mg bei Zusatz von Biotin und Aneurin) und eine Zunahme der Sterine und Sterinester, die im Rahmen der Größenordnung ihres Vorkommens ganz erheblich verstärkt auftraten (Zunahme der Sterine: in der Biotinkultur 50%, in der Biotin-Aneurin-Kultur 120%; Zunahme der Sterinester: in beiden Vitaminkulturen 300%).

Diacylglycerine und freie Fettsäuren traten in den Vitaminkulturen in geringerer Menge auf als in der vitaminfreien Kultur.

Wurde die Kulturdauer des Versuchsansatzes mit Biotin auf 144 h verlängert, konnte eine Steigerung des Trockengewichtes (+ 16%) sowie eine weitere Steigerung der petrolätherlöslichen Lipide (+ 37%) gegenüber der 96 h alten Biotinkultur beobachtet werden.

Diese Lipidzunahme mit steigendem Kulturalter entspricht den Beobachtungen bei den vitaminfreien Kulturen (s. Versuchsansatz 1, S. 34), allerdings war in der 144 h alten Biotinkultur gegenüber der 96 h alten keine Zunahme der Sterine zu erkennen (s. Tabelle 12 und auch Abbildung 7a, S. 36).

Tabelle 13: Trockengewicht, Petrolätherlösliches und Lipidkomponenten von *T. utilis*; Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung mit Zusatz von 13 µg Biotin / Ltr. (1/1 N+B) bzw. 13 µg Biotin und 50 µg Aneurin/ Ltr. (1/ 1 N+B+A); Kulturdauer: 96 und 144 h.

(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

Kulturdauer in h	96	96	144	96	144
WÖLTJE-Lsg.	1/1 N	1/1 N+B	1/1 N+B	1/1 N+B+A	1/1 N+B+A
Trockengew. in mg	199	204	236	191	244
Petrolätherextr. in mg (% vom Trockengew.)	9,6 (4,8)	10,9 (5,3)	16,8 (7,1)	11,8 (6,2)	16,3 (6,7)
Lipidkomponenten (% v. Trockengew.)	DAG	0,4 (0,2)	0,6 (0,3)	0,9 (0,4)	1,0 (0,5)
	St	0,6 (0,3)	0,6 (0,3)	0,9 (0,4)	0,8 (0,3)
	Fs	0,1 (0,05)	0,1 (0,05)	Spur	0,9 (0,4)
	TAG	7,8 (3,9)	9,1 (4,5)	0,15 (0,08)	Spur
	StE	13,8 (5,7)	14,0 (5,9)	9,1 (4,8)	0,8 (0,3)
		0,6 (0,3)	0,5 (0,2)	1,0 (0,4)	0,7 (0,4)

T. utilis zeigt ebenso wie *E. vernalis* bei Zusatz von Biotin kaum eine Veränderung in der Substanzproduktion (Zunahme 2,5 %), jedoch eine Zunahme der petrolätherlöslichen Verbindungen um gut 10 % (s. Tabelle 13). Bei einer Gabe von Biotin und Aneurin zur Nährlösung ließ sich sogar ein etwas geringeres Trockengewicht beobachten (- 4 %) als bei der vitaminfreien Kultur, aber eine Zunahme des Petrolätherlöslichen um 22 %.

Die Steigerung der petrolätherlöslichen Lipide wurde bei der Biotinkultur durch stärkere Synthese der Triacylglycerine (+ 1,3 mg) und in geringem Maße der Diacylglycerine bewirkt. Bei der Biotin + Aneurin-Kultur traten alle Lipidkomponenten vermehrt auf.

Durch eine Verlängerung der Kulturdauer auf 144 h konnte für *T. utilis* eine Steigerung der Trockensubstanz (Steigerung gegenüber der vitaminfreien 96 h alten Kultur 18,5 %, bei Biotin- und Aneurin-Zusatz 22 %) und der petroläther-löslichen Lipide (Steigerung gegenüber der vitaminfreien 96 h alten Kultur bei Biotin-Zusatz 75 %, bei Biotin- und Aneurin-Zusatz 70 %) erzielt werden, wenn der Nährlösung Vitamine (entweder Biotin oder auch Biotin und Aneurin) zuge-
setzt wurde (s. Tabelle 13). Ohne diese Vitamine war nach 96 h Kulturdauer nur noch geringes Wachstum und eine geringe Zunahme des Petrolätherlöslichen festge-
stellt worden (s. Versuchsansatz 1, Tabelle 8 , S. 40).

An der Zunahme der petrolätherlöslichen Lipide waren im Vergleich mit der 96 h alten vitaminfreien Kontrollkultur alle Komponenten außer den freien Fettsäuren beteiligt, diese konnten nur noch in Spuren nachgewiesen werden (s. Tabelle 13, Spalte 3 und 5).

In Abb. 11 und 12 sind noch einmal die Verhältnisse bei vitaminfreier Kultur, bei Zusatz von Biotin zum Nährmedium sowie bei Zusatz von Biotin und Aneurin gra-
phisch dargestellt, um die Unterschiede von *F. vernalis* und *T. utilis* zu ver-
deutlichen.

Aus diesen Abbildungen geht hervor, daß *F. vernalis* bei Zusatz von Biotin und Aneurin zum Nährmedium eine deutliche Substanzzunahme zeigt, *T. utilis* jedoch nicht. Weiterhin wird deutlich, daß die Zunahme des Petrolätherlöslichen bei *F. vernalis* in den Vitaminkulturen gegenüber den vitaminfreien Ansätzen wesent-
lich größer ist als bei *T. utilis*. Diese wesentlich stärkere Steigerung der petrol-
ätherlöslichen Verbindungen wird bei *F. vernalis* hauptsächlich durch eine Zu-
nahme des Triacylglycerinanteils hervorgerufen; Diacylglycerine und freie Fett-
säuren fallen deutlich ab. Bei *T. utilis* hingegen wird eine merkliche Zunahme
des Anteils an Diacylglycerinen und auch der freien Fettsäuren (bei Zusatz von Bio-
tin und Aneurin) beobachtet. Die geringe Zunahme des Petrolätherextraktes in den
Vitaminkulturen gegenüber den vitaminfreien geht aber auch bei *T. utilis* mit
einer Zunahme der Triacylglycerine einher.

Da Biotin als Bestandteil der Acetyl-CoA-Carboxylase (Biotinenzym) eine Schlüs-
selposition in der Fettsäuresynthese einnimmt, sollen zunächst die Fettsäuren der
einzelnen Lipidfraktionen untersucht werden, um dann eventuell weitere Aufschlüsse
über die Wirkung der Vitaminzusätze zu erhalten.

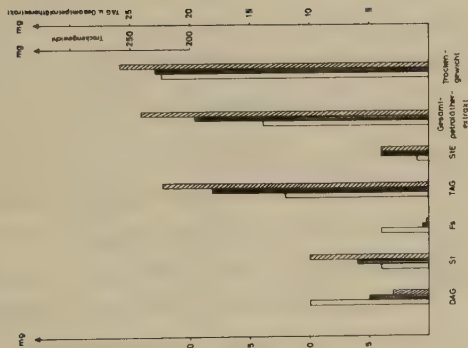


Abb. 11:

Absolutmengen (mg) der Lipidkomponenten, des Gesamt-petrolätherextraktes und des Trockengewichtes von *E. vernalis*; Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung (□), 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. + 13 µg Biotin/Ltr. (▨), 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. + 13 µg Biotin + 50 µg Aneurin/Ltr. (▩); Kulturdauer: 96 h.

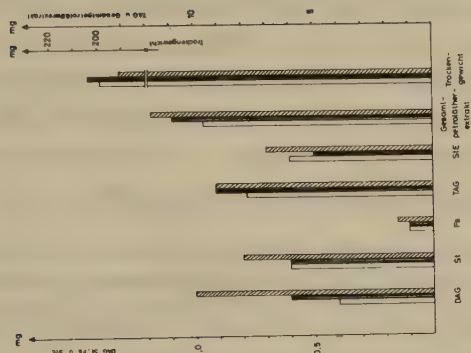


Abb. 12:

Absolutmengen (mg) der Lipidkomponenten, des Gesamt-petrolätherextraktes und des Trockengewichtes von *T. utilis*; Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung (□), 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. + 13 µg Biotin/Ltr. (▨), 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. + 13 µg Biotin + 50 µg Aneurin/Ltr. (▩); Kulturdauer: 96 h.

b) Analysen der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten

Die qualitative gaschromatographische Analyse der Fettsäuren in den Lipidkomponenten von *E. vernalis* und *T. utilis* zeigt, daß auch im Fettsäuremuster durch Zusatz von Vitaminen keine Änderung gegenüber den vitaminfreien Kulturen eingetreten ist. Bezüglich des Fettsäurespiegels der einzelnen Säuren sind jedoch einige charakteristische Verschiebungen zu beobachten. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen für *E. vernalis* zusammengefaßt.

Tabelle 14: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren von *E. vernalis* in den einzelnen Lipidkomponenten. Die Werte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehaltes jeweils einer Lipidfraktion (= 100 %). Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung + 13 µg Biotin/Ltr.; Kulturdauer: 96 h.

(MAG = Monoacylglycerine, DAG = Diacylglycerine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StF = Sterinfettsäureester)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	MAG	1,2-DAG	1,3-DAG	freie Fs	TAG	StF
C ₁₂₌₀	0,27	-	0,2	0,2	0,4	< 0,1	0,6
C ₁₂₌₁	0,38	0,9	0,1	0,1	< 0,1	-	0,2
C ₁₄₌₀	0,51	3,8	1,0	1,1	0,9	0,4	1,9
C ₁₄₌₁	0,62	-	-	-	< 0,1	-	0,2
C ₁₅₌₀	0,73	0,5	0,4	0,5	0,4	0,2	0,5
C ₁₅₌₁	0,85	-	-	-	< 0,1	-	0,2
C ₁₆₌₀	1,00	17,1	14,8	15,7	14,4	16,0	21,3
C ₁₆₌₁	1,17	3,8	0,6	0,4	0,2	0,1	2,1
C ₁₇₌₀	1,46	1,8	0,9	1,0	1,0	1,1	0,6
C ₁₇₌₁	1,66	0,8	0,3	0,4	0,3	0,2	0,4
C ₁₈₌₀	2,02	6,2	6,0	8,8	10,9	13,1	4,6
C ₁₈₌₁	2,28	44,8	41,1	42,8	42,8	48,9	31,3
C ₁₈₌₂	2,95	20,1	31,2	26,9	26,8	18,4	33,3
C ₁₈₌₃	3,99	-	3,3	1,8	1,8	1,5	2,4

Die quantitative Auswertung der Gaschromatogramme zeigt für die Fettsäuren der Biotinkultur von *E. vernalis* bei allen Lipidkomponenten eine Verschiebung des Fettsäurespiegels zugunsten der C₁₈-Säuren (s. Tab. 14).

Dies ist im wesentlichen mit einem Rückgang der C_{16} -Säuren verbunden und teilweise auch der kürzerkettigen Fettsäuren. Bei den Acylglycerinen erfolgt die Zunahme der C_{18} -Säuren durch Steigerung des Linol- und Linolensäure-Anteils (bei den Triacylglycerinen auch durch Zunahme der Stearinsäure), bei den freien Fettsäuren durch verstärktes Auftreten von Stearinsäure und Ölsäure, bei den Sterinestern nur durch den erheblichen Anstieg der Ölsäure (von 14 % in der Kontrollkultur auf 31 %).

Der Zusatz von Biotin und Aneurin zur Nährlösung bewirkt bei allen Fraktionen, außer den freien Fettsäuren, eine erhebliche Zunahme des Linol- und Linolensäure-Anteils, der im wesentlichen auf eine Verminderung des Palmitinsäureanteils beruht (s. Tabellenanhang II, Tab. 6 , S. 111). Sowohl die freien Fettsäuren als auch die Triacylglycerine zeigen wiederum (s. Biotinkultur) eine Vermehrung der Stearinsäure.

Bei verlängerter Kulturdauer und Biotingabe tritt ähnlich wie in den älteren vitaminfreien Kulturen eine weitere Vermehrung der C_{18} -Säuren ein (s. Tabellenanhang II, Tab. 5 , S. 110). Besonders deutlich ist außerdem in der Fraktion der freien Fettsäuren (Steigerung der Ölsäure auf Kosten der Stearinsäure) und in der Fraktion der Sterinester (Zunahme der Linolsäure um 16 %) die Zunahme der Anzahl der Doppelbindungen zu beobachten (s. dazu auch S. 49 f).

Die wesentlichen Änderungen im Fettsäurespiegel durch Biotinzusatz zum Nährmedium bei *T. utilis* sind in Tabelle 15 wiedergegeben. Danach verlaufen auch bei diesem Organismus die Verschiebungen in ähnlicher Weise wie bei zunehmendem Alter von vitaminfreien Kulturen (s. Tab. 15, S. 58).

Die Fraktion der freien Fettsäuren zeichnet sich in der 96 h alten Biotinkultur durch eine Zunahme der Palmitinsäure (Zunahme 12 %) und der Palmitoleinsäure (Zunahme 4 %) auf Kosten der Linolsäure (Rückgang rund 20 % gegenüber der vitaminfreien Kontrollkultur) aus. Bei den Sterinestern ist eine Zunahme des Linolensäureanteils auf Kosten der Ölsäure zu erkennen.

Bei Zusatz von Biotin und Aneurin zur Nährlösung ist bei allen Fraktionen außer den Sterinestern gegenüber der vitaminfreien Kultur eine Zunahme der Ölsäure zu beobachten, was auf eine Verminderung der Linolsäure und teilweise auch der Palmitinsäure (Triacylglycerine) beruht (s. Tabellenanhang II, Tab. 32 , S. 124).

Tabelle 15: Prozentuale Verteilung der C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren von *T. utilis* in den einzelnen Lipidkomponenten. Die Werte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehaltes jeweils einer Lipidfraktion (= 100 %). Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lösung + 13 µg Biotin/Ltr.; Kulturdauer: 96 h.

(DAG = Diacylglycerine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	freie Fs	TAG	StE
C ₁₆₌₀	1, 00	12, 2	12, 4	26, 3	10, 2	2, 4
C ₁₆₌₁	1, 19	2, 4	2, 1	8, 4	1, 9	2, 3
C ₁₈₌₀	1, 99	0, 2	0, 5	1, 9	0, 9	0, 8
C ₁₈₌₁	2, 23	54, 5	60, 3	44, 9	66, 2	74, 3
C ₁₈₌₂	2, 86	27, 8	21, 6	9, 1	19, 2	18, 2
C ₁₈₌₃	3, 94	1, 8	0, 5	0, 6	1, 4	0, 4

Die Fraktion der Sterinester zeigt wie bei der 144 h alten vitaminfreien Kultur und bei der 96 h alten Biotinkultur eine Zunahme der Linolsäure bei gleichzeitiger Verminderung der Ölsäure. Bei den freien Fettsäuren tritt jedoch im Gegensatz zur Biotinkultur nach 96 h Kulturdauer noch keine deutliche Vermehrung der Palmitinsäure ein.

Mit zunehmendem Kulturalter ist bei allen Fraktionen eine Zunahme der höher ungesättigten Fettsäuren (Linol- und Linolensäure) auf Kosten der Ölsäure zu beobachten (s.auch *E. vernalis* und ältere vitaminfrei gezogene Kulturen von *T. utilis*). In der Biotin+Aneurin-Kultur ist nach 144 h in der Fraktion der freien Säuren auch eine Zunahme der Palmitinsäure deutlich zu erkennen.

Bei beiden Organismen wird also durch den Zusatz von Biotin bzw. Biotin + Aneurin bereits in jüngeren Kulturen der Fettsäurespiegel einer älteren aber vitaminfrei gezogenen Kultur erreicht.

Für die Fettheife *E. vernalis* bedeutet dies: Zunahme der C₁₈- Fettsäuren (die für beide Organismen die Endstufe der Fettsäuresynthese bezüglich der Kettenlänge darstellen) in allen Fraktionen, für die Eiweißhefe *T. utilis*: Zunahme der C₁₈- Fettsäuren in allen Fraktionen außer derjenigen der freien Fettsäuren.

Diese Fraktion ist durch Zunahme der C_{16} -Säuren ausgezeichnet. Für beide Organismen bedeutet es weiterhin eine Erhöhung der Anzahl der Doppelbindungen in den Fettsäuren.

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, daß durch die Aufnahme des Biotins aus der Nährlösung von *E. vernalis* (s. dazu auch H.-C. YANG u. Mitarb., 1969) die Bildung der Acetyl-CoA-Carboxylase beschleunigt wird, daß bei *T. utilis* mindestens die Eigensynthese des Biotins angeregt wird (s. A. J. A. KERÄNEN, 1969) und daß damit auch bei diesem Organismus die Bildung von Acetyl-CoA-Carboxylase schneller abläuft. Dadurch wird vermutlich bereits zu einem früheren Zeitpunkt (junge Kulturen) der Fettsäurespiegel älterer, vitaminfrei gezogener Kulturen erreicht.

E. vernalis reagiert auf die durch Biotin verstärkt induzierte Fettsäuresynthese mit deutlich erhöhter Bildung von Triacylglycerinen, *T. utilis* jedoch nur in geringerem Maße (s. S. 53). Bei diesem Organismus scheint der Regulationsmechanismus der Fettsäuresynthese mindestens teilweise über die Hemmung des Biotinenzym durch langkettige Acyl-CoA-Derivate, besonders durch Palmityl-CoA und Palmitoleyl-CoA, abzulaufen (s. auch D. WHITE und H. P. KLEIN, 1966; P. KARLSON, 1974).

3) Lipidbildung in Abhängigkeit von der Stickstoffernährung

E. vernalis läßt sich unter Stickstoffmangelbedingungen besonders gut, *T. utilis* weniger gut verfetten (S. HEIDE, 1939; H. RAAF, 1941; M. STEINER, 1941; K. L. SCHULZE, 1950; s. auch B. WITTER, 1974; P. S. S. DAWSON und M. CRAIG, 1966; P. S. S. DAWSON, 1970).

Für eine eingehendere Klärung der Lipidsynthese unter N-Mangelbedingungen sollten *E. vernalis* und *T. utilis* unter den gleichen Kulturbedingungen hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Lipidkomponenten und insbesondere der Fettsäurebildung miteinander verglichen werden.

a) Aufzucht-kulturen

Versuchsansatz (3):

Die Versuchsorganismen wurden auf Oberflächenkulturen in WÖLTJE-Lösung gezogen, die abgestufte Mengen (1; 1/2; 1/4; 1/8 %) Asparagin enthielten, und nach 96 h geerntet.

Die Lipide wurden nach der Gefriertrocknungsmethode (s.S. 7) gewonnen und analysiert, außerdem wurden die Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten untersucht.

α) Trockengewichts- und Lipidproduktion sowie Analyse der Lipidkomponenten

Zunächst seien in Tabelle 16 die Verhältnisse der Fett- und Trockensubstanzbildung bei *E. vernalis* und *T. utilis* unter den angegebenen Analysenbedingungen zusammengefaßt:

Tabelle 16: Trockensubstanzbildung und Fettproduktion von *E. vernalis* und *T. utilis* bei abgestufter N-Gabe. 1/1 N, 1/2 N, 1/4 N, 1/8 N entspricht 1, 1/2, 1/4, 1/8 % Asparagin in der WÖLTJE-Lösung; Kulturdauer: 96 h. Die Analysendaten sind Mittelwerte aus je 3 Kulturschalen.

WÖLTJE-Lösung	<i>E. vernalis</i>		<i>T. utilis</i>	
	Trockengew. in mg	Petrolätherlösliches in mg (% vom Trockengew.)	Trockengew. in mg	Petrolätherlösliches in mg (% vom Trockengew.)
1/1 N	295	18,3 (6,2)	253	14,9 (5,9)
1/2 N	280	24,9 (8,9)	218	18,7 (8,6)
1/4 N	225	34,9 (15,5)	136	12,6 (9,3)
1/8 N	103	23,6 (20,1)	54	2,75 (5,2)

E. vernalis zeigt bei 1/2 N eine kaum veränderte Trockensubstanzbildung gegenüber der normalen WÖLTJE-Lösung, aber einen deutlich gesteigerten Fettgehalt (24,9 mg pro Kulturschale gegenüber 18,3 mg in der 1/1 N -Kultur). Mit verringertem N-Gehalt steigt der prozentuale Fettgehalt (bei 1/8 N: 20,1 % Petrolätherlösliches vom Trockengewicht). Für die geplanten Versuchsansätze war offensichtlich die 1/4 N -Kultur die geeignetste, weil bei relativ hohem Trockengewicht ein Maximum an petrolätherlöslichen Verbindungen (34,9 mg pro Kulturschale = 15,5 % vom Trockengewicht) synthetisiert wird.

T. utilis zeigt bereits bei 1/2 N eine Abnahme des Trockengewichtes und erreicht hierbei das Maximum an Petrolätherlöslichem (18,7 mg pro Kulturschale gegenüber 14,9 mg in der 1/1 N -Kultur).

Bei 1/4 N ist jedoch das Maximum des auf das Trockengewicht bezogenen prozentualen Lipidgehalts (9,3 % gegenüber 5,9 % bei 1/1 N) erreicht. Deshalb wurde für *T. utilis* bei den weiteren Untersuchungen ebenfalls der Kulturansatz mit 1,4 % Asparagin in der Nährlösung verwendet.

Hinsichtlich der qualitativen Zusammensetzung der petrolätherlöslichen Lipidfraktion wurden keine Unterschiede zu den stickstoffreichen Kulturen gefunden. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen der Lipidkomponenten sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Tabelle 17: Gesamt-Petrolätherextrakt (Mittelwert aus je 3 Kulturschalen) und Lipidkomponenten von *E. vernalis* und *T. utilis*. Nährmedium: 1/1 N- und 1/4 N-WÖLTJE-Lösung; Kulturdauer: 96 h.

(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StF = Sterinfettsäureester)

WÖLTJE-Lösung		<i>E. vernalis</i>		<i>T. utilis</i>	
		1/1 N	1/4 N	1/1 N	1/4 N
Gesamt-Petrolätherextrakt in mg		18,3	34,9	14,9	12,6
Lipidkomponenten (% v. Petroläther- extr.)	DAG	1,3 (7,0)	0,5 (1,4)	0,6 (4,1)	0,3 (2,6)
	St	0,5 (2,8)	0,1 (0,4)	1,0 (6,5)	0,3 (2,1)
	Fs	0,5 (2,8)	Spur	0,2 (1,3)	0,05 (0,6)
	TAG	15,8 (86,3)	34,2 (97,9)	12,2 (81,5)	9,8 (78,2)
	StF	0,2 (1,1)	0,1 (0,3)	0,9 (5,9)	1,7 (13,4)

Die Zunahme des Gesamt-Petrolätherextraktes bei *E. vernalis*, die bei N-Mangel eintritt, ist allein auf die deutliche Zunahme des Triacylglycerinanteils zurückzuführen (1/1 N: 15,8 mg, 1/4 N: 34,2 mg pro Kulturschale). Alle anderen Verbindungen der petrolätherlöslichen Lipidfraktion sind dagegen in der N-Mangelkultur in deutlich geringerer Konzentration vorhanden.

Die Eiweißhefe *T. utilis* reagiert auf die N-Mangelbedingungen in der Zusammensetzung der petrolätherlöslichen Lipide ganz anders als die Fetthefe *E. vernalis*. Es tritt keine verstärkte Bildung der Triacylglycerine ein.

Abgesehen von dem leichten Rückgang des gesamten Petrolätherextraktes, der auch die Triacylglycerine betrifft (Rückgang von 12,2 mg in der 1/1 N-Kultur auf 9,8 mg in der 1/4 N-Kultur), ist auch der prozentuale Anteil dieser Fraktion vom Petrolätherlöslichen zurückgegangen (von 81,5 % auf 78,2 %). Deutlicher zeigt sich der N-Mangel bei dieser Eiweißhefe in dem Anstieg der Sterinfettsäureester von 5,9 % (= 1/1 N-Kultur) auf 13,4 %.

Dieses unterschiedliche Reagieren der Fetthefe *E. vernalis* und der Eiweißhefe *T. utilis* auf den N-Mangel kann dahingehend erklärt werden, daß *T. utilis* kaum auf N-Mangel mit einer Umlenkung der C-Quelle in eine zusätzliche Synthese der petrolätherlöslichen Lipide reagiert und außerdem, daß der N-Mangel bei *T. utilis* rascher zu einer "Alterung" der Kultur führt.

β) Analyse der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten

Die gaschromatographischen Analysen der FsME der Lipidkomponenten beider Organismen lassen qualitativ keine Unterschiede zwischen stickstoffreicher und stickstoffarmer Ernährung erkennen.

Die quantitative Auswertung der Gaschromatogramme zeigt, daß die Zusammensetzung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten bei den Versuchsorganismen variieren (s. Tabellenanhang II, Tab. 7 u. 34, S. 111 u. 125).

Für *E. vernalis* werden diese Veränderungen in einer Zusammenstellung der Fettsäuren nach der Kettenlänge besonders deutlich (Tab. 18; s. auch Tabellenanhang II, Tab. 7 , S. 111).

Tabelle 18: Prozentualer Anteil der Fettsäuren mit weniger als 16 C-Atomen, 16 C-Atomen und 18 C-Atomen, der freien Fettsäuren und der Sterinester von *E. vernalis*; Nährmedium: 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. und 1/4 N-WÖLTJE-Lsg; Kulturdauer: 96 h.

WÖLTJE-Lösung	1/1 N		1/4 N	
Fettsäuren	freie Fs	Sterinester	freie Fs	Sterinester
C-Zahl < 16	2,9	12,5	43,8	42,1
C-Zahl = 16	20,9	31,2	17,7	8,5
C-Zahl = 18	75,1	55,6	38,0	57,1

Im Petrolätherextrakt der stickstoffarmen Kultur von *E. vernalis* fiel besonders der ausgesprochen hohe Anteil an kürzerkettigen Fettsäuren (über 40 %) bei den freien Fettsäuren und den Sterinestern auf. Demzufolge waren in diesen beiden Fraktionen die prozentualen Anteile an C_{16} - (bei den Sterinestern) bzw. C_{18} -Säuren (bei den freien Fettsäuren) erheblich niedriger als bei der stickstoffreichen Kultur.

Die stickstoffarm gezogene Kultur von *T. utilis* zeichnete sich gegenüber der stickstoffreichen durch einen größeren Anteil an C_{16} -Säuren aus, der mit einer deutlich verringerten Menge an Linolsäure verknüpft war (s. Tabelle 19, s. auch Tabellenanhang II, Tab. 34 , S. 125).

Tabelle 19: Prozentualer Anteil an C_{16} -Fettsäuren und Linolsäure der Lipidkomponenten von *T. utilis* bei stickstoffreicher (1/1 N-WÖLTJE-Lösung) und stickstoffarmer (1/4 N-WÖLTJE-Lösung) Ernährung. Kulturdauer: 96 h. Die Werte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidfraktion (= 100 %).

(DAG = Diacylglycerine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

Fettsäuren	C_{16}		$C_{18=2}$	
	1/1 N	1/4 N	1/1 N	1/4 N
1,2-DAG		24,7		11,5
1,3-DAG	} 14,4	21,0	} 28,1	10,3
freie Fs	19,3	39,9	30,4	5,1
TAG	10,8	24,5	21,6	11,0
StE	0,7	3,7	10,7	8,7

Diese Verschiebung war bei allen Komponenten sichtbar, trat aber am stärksten bei den freien Fettsäuren hervor. Palmitin- und Palmitoleinsäure waren in dieser Fraktion bei der stickstoffarmen Kultur in etwa der doppelten Menge (zusammen rund 40 %) vorhanden wie in der stickstoffreichen (zusammen rund 20 %). Der Anteil an Linolsäure betrug nur noch 1/6 der Menge der stickstoffreichen Kultur, der der Linolensäure nur noch etwa 1/20 (s. Tabellenanhang II, Tab. 34 , S. 125).

Auch in der Zusammensetzung des Fettsäurespiegels der einzelnen Säuren sind also bei *E. vernalis* und *T. utilis* deutliche Unterschiede in der Reaktion auf N-Mangelbedingungen zu beobachten.

E. vernalis zeichnet sich durch einen erheblichen Zuwachs an kürzerkettigen Fettsäuren in den Fraktionen der freien Säuren und der Sterinester aus, *T. utilis* jedoch durch eine markante Zunahme der C_{16} -Fettsäuren in allen Fraktionen.

Über einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem N-Mangel und dem bei *E. vernalis* gehäuftten Auftreten kürzerkettiger Fettsäuren nur in den Fraktionen der freien Säuren und der Sterinester kann aufgrund unserer Untersuchungen zur Zeit keine genaue Aussage gemacht werden. Möglicherweise spielt jedoch das Defizit an Pyridinnucleotiden (NAD, NADP) bei N-Mangel (G.DREPHAL, 1969), die an der Kettenverlängerung und am Abbau der Fettsäuren maßgeblich beteiligt sind, eine Rolle

Bei *T. utilis* tritt eventuell auch bei N-Mangel wieder eine Hemmung der Fettsäuresynthese durch Palmityl- und Palmitoleyl-CoA ein (Anstieg der C_{16} -Säuren bei gleichzeitigem Rückgang der freien Fettsäuren und der Acylglycerine) und damit eine Beschränkung der Triacylglycerinbildung (s. Biotinkultur, S. 59). *E. vernalis* verfügt jedoch offensichtlich über einen Regulationsmechanismus zur Triacylglycerinsynthese, der nicht ausschließlich über die Synthese langkettiger Fettsäuren angeregt werden kann (s. Biotinkulturen, S. 59 ; s. auch S.W. CHALLINOR und N.W.R. DANIELS, 1955; T.SHAFAI und L.M.LEWIN, 1968).

b) Umpflanzkulturen

Die Problematik der Oberflächenkulturen durch Differenzierung des Mycels in der Pilzdecke ist bereits von S.HEIDE (1939) und K.L.SCHULZE (1950) beschrieben worden. Es ist also nicht ausgeschlossen, daß auch bei stickstoffreicher Kultivierung ein Teil der Zellen aus den oberen Mycelschichten bereits unter N-Mangel wächst. Um die Unterschiede von stickstoffreicher und stickstoffarmer Oberflächenkultur bei *E. vernalis* differenzierter zu untersuchen, wurden Umpflanzkulturen angesetzt. Diese gestatten, einerseits durch den Wechsel von stickstoffreicher und stickstoffarmer Ernährung die tatsächlichen N-Mangelbedingungen besser zu erfassen, andererseits, mit ausreichendem Pilzmaterial den Beginn oder das Ende des Stickstoffmangels nach kürzerer Kulturdauer zu ermitteln.

α) Stickstoffreiche Vorzucht und Umpflanzung auf N-Mangel-Nährmedium

Versuchsansatz(4):

E. vernalis wurde auf Oberflächenkulturen 96 h in 1/1 N-WÖLTJE-Lösung vorgezogen, dann auf Nährlösung mit 1/4 % Asparagin umpflanzt und 12, 24 und 35 h nach dem Umpflanzen geerntet. Die Lipide wurden nach der Gefriertrocknungsmethode und Extraktion mit Petroläther gewonnen (s.S. 7) und analysiert, außerdem wurden die Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten untersucht.

αα) Trockengewichts- und Lipidproduktion sowie Analyse der Lipidkomponenten

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bezüglich Trockengewichts- und Lipidbildung sowie die Verteilung der Lipidkomponenten sind in Tabelle 20 zusammengestellt worden.

Tabelle 20: Trockengewicht, Petrolätherlösliches und Lipidkomponenten der Umpflanzkulturen von *E. vernalis*; Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg, nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg; Ernte: 12, 24 und 35 h nach dem Wechsel des Nährmediums.

(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

		Kontrolle	Kulturdauer in h nach der Umpflanzung		
Kulturdauer in h		96	12	24	35
Trockengew. in mg		300	330	391	513
Petroläther-extr. in mg (% v. Trockengew.)		15,0 (5,0)	15,5 (4,7)	19,9 (5,1)	36,9 (7,2)
Lipidkomponenten (% v. Trockengew.)	DAG	1,0 (0,33)	0,4 (0,1)	0,1 (0,02)	0,6 (0,1)
	St	0,4 (0,13)	0,3 (0,09)	0,3 (0,07)	0,1 (0,02)
	Fs	0,4 (0,13)	0,09 (0,03)	< 0,1	< 0,1
	TAG	13,0 (4,3)	14,7 (4,5)	19,5 (5,0)	36,2 (7,1)
	StE	0,2 (0,07)	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Nach dem Umpflanzen auf die N-Mangel-Nährlösung nimmt bis zum Ende des Versuchs das Trockengewicht kontinuierlich zu (Kontrolle: 300 mg, 35 h nach dem Umpflanzen 513 mg pro Kulturschale, s. Tab.20 und Abb. 13). Der Gesamt-Petrolätherextrakt steigt zunächst jedoch kaum (12 h nach dem Umpflanzen 3 % Zunahme, s. Abb.13) und läßt erst 35 h nach der Umpflanzung die für N-Mangel typische starke Zunahme erkennen (s.auch S. 60). Der anfänglich kaum veränderte Gehalt an petrolätherlöslichen Lipiden bei einer deutlichen Zunahme des Trockengewichtes (daraus ergibt sich auch der Rückgang des relativen Lipidgehalts von 5 auf 4,7 %) veranlaßt die Annahme, daß bereits am Ende der Vorkultur mit 1/1 N-WÖLTJE-Lösung für einige Zellen N-Mangel geherrscht haben muß, was zu einer Neutrallipidbildung führte, und daß durch die erneute N-Gabe - wenn es auch nur 1/4 % Asparagin war - ein neues Zellwachstum ohne wesentliche Neubildung petrolätherlöslicher Lipide erfolgte.

Betrachtet man jedoch die Verteilung der Fraktionen des Petrolätherextraktes, so ist bereits 12 h nach dem Umpflanzen eine Verschiebung in Richtung N-Mangelsymptome (s.S. 61) offensichtlich, nämlich die Zunahme der Triacylglycerine und die Abnahme aller anderen Komponenten. Diese Tendenz bleibt im weiteren Kulturverlauf erhalten und wird nur durch eine erneute Zunahme des Diacylglycerinanteils nach 35 h leicht variiert (s.Abb. 13).

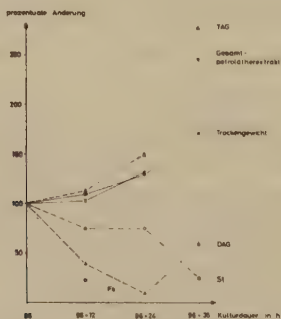


Abb. 13:

Änderungen des Trockengewichtes, des Gesamt-Petrolätherextraktes und der Lipidkomponenten bei Umpflanzkulturen von *E. vernalis*; Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg; Ernte: 12, 24 und 35 h nach dem Wechsel des Nährmediums. Die Analysenwerte geben die prozentuale Veränderung gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung (=100%) an.
(Fs = Fettsäuren, St = Sterine, DAG = Diacylglycerine, TAG = Triacylglycerine)

ββ) Analyse der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten

Bei den Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten (s. Tabellenanhang II, Tab. 8 bis Tab. 10 und Abb. 15 , S. 72) zeigen sich in einer Zusammenfassung der Fettsäuren nach der Kettenlänge bei der Umpflanzkultur auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung im ganzen Kulturverlauf keine starken Unterschiede gegenüber der N-reichen Kultur wie bei der Aufzuchtkultur auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung. Der einzige deutliche Unterschied liegt hier in der Verminderung der C_{16} -Fettsäuren um 10 - 15 % bei den Sterinestern, die bei der Umpflanzkultur auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung aber durch vermehrtes Auftreten der C_{18} -Säuren und auch kürzerkettiger Fettsäuren hervorgerufen wurde und nicht wie bei der Aufzuchtkultur auf 1/4 N allein durch einen hohen Anteil an kürzerkettigen Fettsäuren. Alle Komponenten enthielten bereits 12 h nach dem Umpflanzen einen größeren Anteil an Ölsäure und einen niedrigeren an Palmitinsäure. Bei Triacylglycerinen und Sterinestern war bis zum Ende der Kulturreihe auch eine ständige Zunahme der Linolsäure zu beobachten, was mit dem zunehmenden Kulturalter zusammenhängen mag.

Wie auch in den N-reichen und der N-armen Aufzuchtkultur zu beobachten war (s. Tabellenanhang II, Tab. 1 u. 7, 8-10), fällt hier ebenso auf, daß die 1,2-Diacylglycerine in allen Altersstufen mehr Linolsäure (zwischen 20 und 30 %) enthalten als die 1,3-Diacylglycerine (zwischen 10 und 20 %).

β) Vorkultivierung auf N-Mangel-Nährlösung

In zwei weiteren Versuchsansätzen sollte geprüft werden, wie die Synthese der petrolätherlöslichen Lipide durch Vorkultivierung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung und Umpflanzung auf 1/1 N- bzw. 1/4 N-WÖLTJE-Lösung beeinflusst wird.

Versuchsansatz (5) und (6):

E. vernalis wurde auf Oberflächenkulturen 96 h in 1/4 N-WÖLTJE-Lösung vorgezogen, dann auf Nährlösung mit 1 % (5) und 1/4 % (6) Asparagin umgepflanzt und 6, 12 und 24 h nach dem Wechsel des Nährmediums geerntet. Die petrolätherlöslichen Lipide wurden nach der Gefriertrocknungsmethode gewonnen und analysiert, außerdem wurden die Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten untersucht.

αα) Trockengewichts- und Lipidproduktion sowie quantitative Bestimmungen
der Lipidkomponenten

Wie aus Tabelle 21 hervorgeht, steigt in Versuchsansatz (5) nach dem Umpflanzen auf die neue Nährlösung (1/1 N-WÖLTJE-Lsg.) das Trockengewicht kontinuierlich an (225 mg zum Zeitpunkt der Umpflanzung, 384 mg pro Kulturschale 24 h später), der Gesamt-Petrolätherextrakt fällt jedoch zunächst ab (von 34,9 in der Kontrolle auf 31,1 mg pro Kulturschale 6 h nach dem Umpflanzen), steigt dann geringfügig wieder an, bleibt aber bis 24 h nach dem Wechsel des Nährmediums unter dem Kontrollwert; d.h. es hat Zellwachstum ohne wesentliche Synthese von petrolätherlöslichen Lipiden stattgefunden.

Tabelle 21: Trockengewicht und Petrolätherlösliches von *E. vernalis*; Vorzucht auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung, nach 96 h Umpflanzung a) 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. und b) auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. Die Werte sind Mittelwerte aus je 4 Kulturschalen.

	Kontrolle	Kulturdauer in h nach dem Umpflanzen		
Kulturdauer in h	96	6	12	24
Trockengew. in mg	225	Umpflanzung auf 1/1 N-WÖLTJE-Lösung		
		250	284	384
Petrolätherextr. in mg (% vom Trockengew.)	34,9 (15,5)	31,1 (12,5)	33,8 (11,9)	34,1 (8,9)
Trockengew. in mg	225	Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung		
		252	253	380
Petrolätherextr. in mg (% vom Trockengew.)	34,9 (15,5)	29,1 (11,7)	29,1 (11,5)	41,3 (10,9)

Dies Ergebnis deutet ebenfalls darauf hin (s.auch S. 66), daß bei ausreichender Stickstoffversorgung eine Neusynthese von Neutrallipiden ausbleibt (s.dazu auch P.S.S.DAWSON, 1970 und S. 66).

Der Rückgang des Petrolätherlöslichen nach dem Umpflanzen ist allein auf eine Abnahme der Triacylglycerine zurückzuführen (s.Abb.14). Mit der neuen N-Gabe steigt jedoch der Gehalt an Sterinen und freien Fettsäuren.

In Versuchsansatz (6) (s. Tab. 21) steigt unmittelbar nach dem Umpflanzen auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung das Trockengewicht zunächst an, stagniert dann bis 12 h nach dem Wechsel des Nährmediums (252 bzw. 253 mg pro Kulturschale). Erst danach tritt ein erneutes Zellwachstum ein (Steigerung des Trockengewichtes auf 380 mg pro Kulturschale, s. Tab. 21). Der Gesamtpetrolätherextrakt dieser Kultur fällt nach dem Umpflanzen noch stärker ab als in Versuchsansatz (5) (von 34,9 mg in der Kontrolle auf 29,1 mg pro Kulturschale 6 h nach dem Umpflanzen; s. Tab. 21 und Abb. 14). 24 h nach dem Umpflanzen steigt der Gesamtpetrolätherextrakt als Folge der erneuten N-Mangelernährung deutlich über den Kontrollwert an (auf 41,3 mg pro Kulturschale).

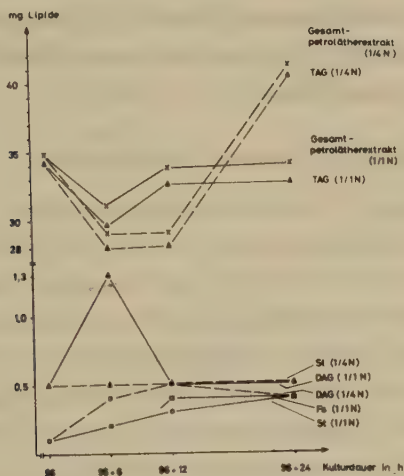


Abb. 14: Gesamtpetrolätherextrakt und Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Vorzucht auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf a) 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. (—) und b) auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. (----). Die Werte sind Mittelwerte aus je 4 Kulturschalen.

(DAG (Δ) = Diacylglycerine, TAG ($\blacktriangle$) = Triacylglycerine, St ($\circ$) = Sterine, Fs ($\square$) = Fettsäuren, Gesamtpetrolätherextrakt (x)

Auch bei diesem Versuchsansatz ist die Abnahme des Petrolätherlöslichen auf einen Rückgang der Triacylglycerine beschränkt (s. Abb. 14). Ebenso wie beim Trockengewicht tritt eine erneute Zunahme erst nach 12 h ein.

Wie in Versuchsansatz (5) steigt mit der neuen N-Gabe der Steringehalt, er sinkt nach 24 h Kulturdauer auf der zweiten N-Mangelnährlösung wieder ab (s.auch Versuchsansatz (4)).

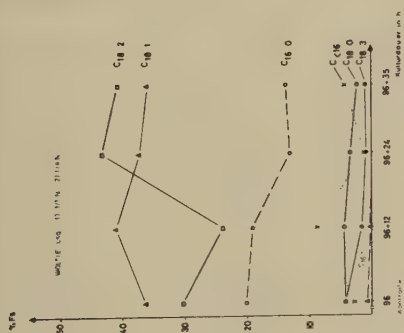
Bei Vorkultur auf einem N-Mangelnährmedium ist *E. vernalis* offensichtlich nicht in der Lage, die neue Nährlösung mit allen gebotenen Nährstoffen sofort vollständig zu nutzen (s.dazu C.C.LINDEGREN, 1945), sondern verwertet zunächst die bereits gebildeten Triacylglycerine als sofort verfügbare Kohlenstoff- und Energiequelle (Rückgang dieser Lipidkomponenten nach dem Umpflanzen, s.Abb.18), um neues Zellmaterial zu synthetisieren (Anstieg des Trockengewichtes bei gleichzeitigem Rückgang des Petrolätherextraktes). Gleichzeitig mit dem Zellwachstum findet ein Anstieg des Anteils der Sterine statt, der unmittelbar nach dem Wechsel des Nährmediums (bei Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg.) oder erst nach 24 h (bei Umpflanzung auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.) den Wert der 96 h alten Aufwuchskultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lösung erreicht.

ββ) Analyse der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten

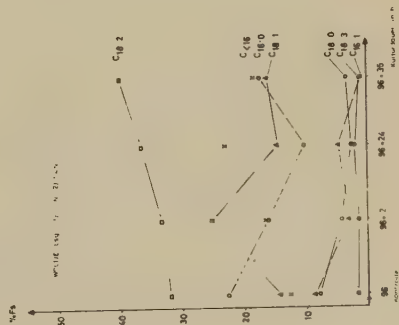
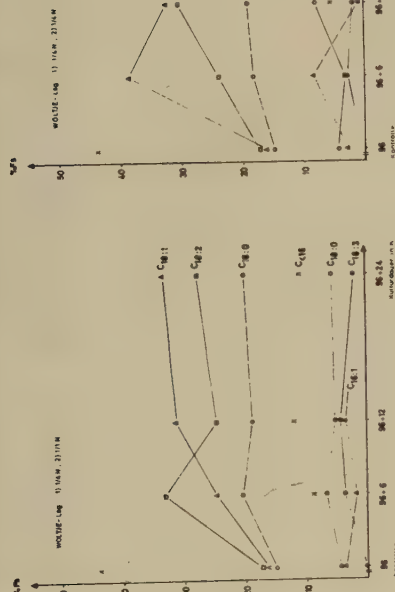
Die prozentuale Verteilung der Fettsäuremethylester der freien Fettsäuren (a), der Triacylglycerine (b) und der Sterinester (c) aller drei Umpflanzkulturen (Versuchsansatz (4-6)) ist in Abb.15 a-c wiedergegeben (s.auch Tabellenanhang II, Tab.8-16, S.112 ff). Die Veränderungen der FsME in Versuchsansatz (4) (Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lösung und Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung) sind bereits auf S. 67 beschrieben worden. In den beiden Kulturansätzen mit Vorzucht auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung fällt zunächst auf, daß wiederum bei den freien Fettsäuren und besonders den Sterinestern die Veränderungen durch die verschiedenen Nährmedien am deutlichsten zu erkennen sind. Bei den freien Fettsäuren sind die Änderungen 12 h nach dem Umpflanzen beendet, bei den Sterinestern dauert die Verschiebung der prozentualen Anteile der einzelnen Komponenten bis zum Kulturende an.

Weiterhin ist in beiden Kulturansätzen der starke Abfall des Anteils an kürzerkettigen Fettsäuren sowohl bei den freien Fettsäuren als auch bei den Sterinestern unmittelbar nach dem Umpflanzen zu beobachten (Rückgang von über 42 % bei beiden Komponenten auf rund 9 % bei den Sterinestern beider Kulturansätze und 3 bzw. 9 % bei den freien Säuren der Umpflanzkultur auf 1/4 N- bzw. 1/1 N-WÖLTJE-Lösung).

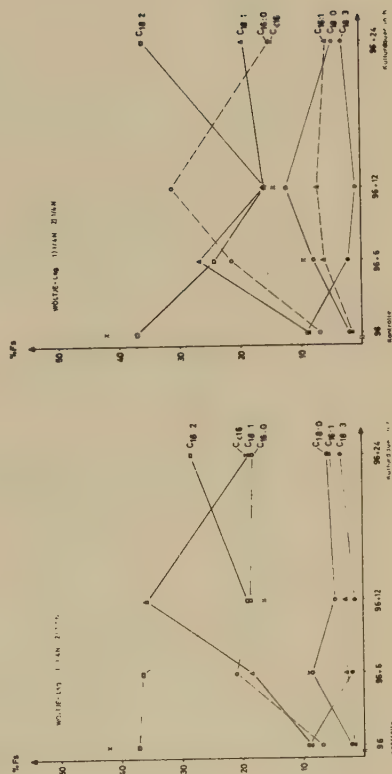
In der Umpflanzkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lösung bleibt der Anteil jedoch immer etwas höher als in der Kultur, die auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung umgepflanzt wurde. Dieser Minderung des Anteils an kürzerkettigen Fettsäuren steht ein stärkeres Vorkommen von Linol- und Ölsäure gegenüber, bei den Sterinestern aber ein Ansteigen von Palmitin- und Ölsäure. Deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden Kulturansätzen (5 und 6) sind bei den Fettsäuren der Sterinester im Kulturverlauf zu erkennen: Der Anstieg der Palmitinsäure erfolgt bei Versuchsansatz (6) bis 12 h nach dem Umpflanzen auf 31,1 %, bei Versuchsansatz (5) jedoch nur bis 6 h nach dem Umpflanzen und nur auf 20,9 %; dafür ist in diesem Kulturansatz nach 12 h ein Gehalt von 35,6 % Ölsäure zu verzeichnen. Bei Kulturende ist für beide Kulturen die Linolsäure die Hauptkomponente (Versuchsansatz (5): 28,2 %; Versuchsansatz (6): 35,7 %). Wie auch in den vorangegangenen Kulturen ist jeweils der Anteil an Linolsäure bei den 1,2-Diacylglycerinen um gut 10 % höher (30 - 37 % in beiden Kulturen) als bei den 1,3-Diacylglycerinen (17 - 25 % in beiden Kulturen; s. Tabellenanhang II, Tab.11-16, S. 113 f).

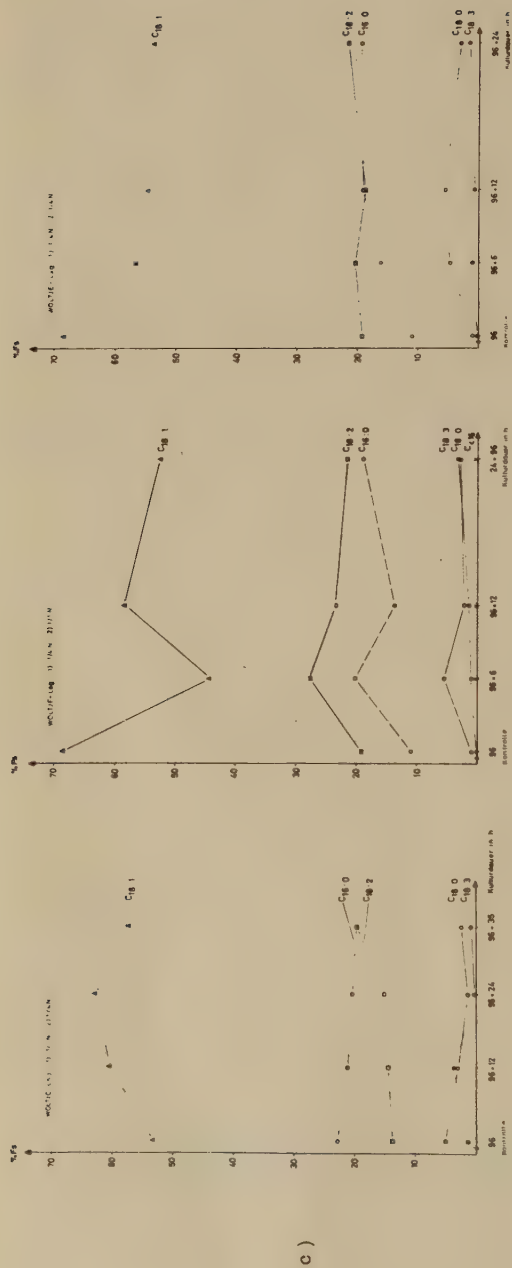


a)



b)





I

II

III

Abb. 15 a-c: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren von Umpflanzkulturen von *E. vernalis*.
a_{I-III}) freie Fettsäuren; b_{I-III}) Fettsäuren der Sterinester; c_{I-III}) Fettsäuren der Triacylglycerine
Nährmedien: I: Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg.;
II: Vorzucht auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.;
III: Vorzucht auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg.

4. Lipidbildung bei Zusatz von Natriumacetat zum Nährmedium und bei Natriumacetat als einziger Kohlenstoffquelle

E. vernalis läßt sich nicht auf Ammoniumacetat als einziger Kohlenstoffquelle kultivieren (H. RAAF, 1941). Auch andere Fettsäuren (bis C_{14}) eignen sich nicht als C-Quelle bei der Aufzucht dieses Organismus (R. KLEMM, 1961). Bei ruhenden Kulturen, die auf WÖLTJE-Lösung vorgezogen wurden, tritt allerdings nach Zusatz von Natriumacetat (H. HAEHN und W. KINTTOF, 1925) oder Acetaldehyd (H. RAAF, 1941) zur Nährlösung verstärkte Fettbildung bei gleichzeitiger Abnahme des Trockengewichtes ein.

T. utilis hingegen wächst auf Essigsäure oder Äthanol als C-Quelle völlig normal (H. FINK u. Mitarb., 1937). In neueren Arbeiten wurde das Wachstum von *T. utilis* auf Natriumacetat als einziger C-Quelle (K. OGATA u. Mitarb., 1970) und als hauptsächlicher Kohlenstoffquelle zur eventuellen Verwertung von Abwässern der Acetylcellulose-Produktion untersucht (F. J. CAMA und V. H. EDWARDS, 1970).

Das gegensätzliche Verhalten von *E. vernalis* und *T. utilis* bei der Nutzung von Essigsäure als C-Quelle sollte im Hinblick auf die Fettsynthese untersucht werden. Hierbei wurden Umpflanzkulturen verwendet, um mit genügend Pilzmaterial die Wirkung des Natriumacetats bei beginnendem N-Mangel zu erfassen. Die Konzentration des Natriumacetats in der Nährlösung wurde entsprechend den Befunden von K. OGATA u. Mitarb. (1970) auf 1% festgelegt.

Versuchsansatz (7) und (8):

Die Versuchsorganismen wurden auf Oberflächenkulturen in 1/1 N-WÖLTJE-Lösung 96 h vorgezogen, dann auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung (*E. vernalis*) bzw. 1/2 N-WÖLTJE-Lösung (*T. utilis*) mit 6,5 % Saccharose und 1 % Natriumacetat als Kohlenstoffquelle (7) und auf 1/4 N- (1/2 N-) WÖLTJE-Lösung mit 1 % Natriumacetat als einziger Kohlenstoffquelle (8) umgepflanzt und nach 12, 24 und 36 h geerntet. Die Natriumacetat enthaltenden Nährlösungen wurden mit 10 n Salzsäure auf pH 4,5 (pH der WÖLTJE-Lösung) eingestellt. Die Lipide wurden nach der Gefriertrocknungsmethode gewonnen und analysiert, außerdem wurden die Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten untersucht.

a) Trockengewichts- und Lipidproduktion sowie quantitative Verteilung der Lipidkomponenten

Die Ergebnisse der quantitativen Auftrennung der petrolätherlöslichen Lipide von *E. vernalis* sind in Tabelle 22 zusammengefaßt.

Tabelle 22: Trockengewicht, Petrolätherlösliches und Lipidkomponenten der Umpflanzkulturen von *E. vernalis*; Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. mit 6,5% Saccharose und 1% Natriumacetat bzw. 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. mit 1% Natriumacetat als Kohlenstoffquelle.

(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

		Kontrolle	Kulturdauer in h nach dem Umpflanzen		
			12	24	36
			Kohlenstoffquelle: 6,5% Saccharose und 1% Natriumacetat		
Trockengew. in mg		254	216	203	189
Petrolätherextr. in mg (% v. Trockengewicht)		9,6 (3,8)	8,0 (3,7)	8,5 (4,2)	9,4 (5,0)
Lipidkomponenten (% v. Trockengew.)	DAG	0,67 (0,26)	0,015 (0,007)	0,08 (0,04)	0,1 (0,05)
	St	0,27 (0,11)	0,26 (0,12)	0,25 (0,12)	0,25 (0,12)
	Fs	0,27 (0,11)	0,17 (0,08)	0,49 (0,24)	0,51 (0,27)
	TAG	8,28 (3,26)	7,55 (3,50)	7,58 (3,73)	8,53 (4,51)
	StE	0,10 (0,04)	Spur	0,1 (0,05)	Spur
			Kohlenstoffquelle: 1 % Natriumacetat		
Trockengew. in mg		254	224	178	177
Petrolätherextr. in mg (% v. Trockengewicht)		9,6 (3,8)	9,4 (4,2)	8,0 (4,5)	8,8 (5,0)
Lipidkomponenten (% v. Trockengew.)	DAG	0,67 (0,26)	0,05 (0,02)	0,02 (0,01)	0,05 (0,03)
	St	0,27 (0,11)	0,32 (0,14)	0,22 (0,12)	0,19 (0,11)
	Fs	0,27 (0,11)	0,35 (0,16)	0,43 (0,24)	0,74 (0,42)
	TAG	8,28 (3,26)	8,67 (3,87)	7,32 (4,11)	7,74 (4,37)
	StE	0,10 (0,04)	Spur	Spur	0,07 (0,04)

In beiden Kulturansätzen sinkt das Trockengewicht vom Zeitpunkt der Umpflanzung bis zum Kulturende (s. Tabelle 22). Auch der Gehalt an petrolätherlöslichen Lipiden bleibt nach dem Wechsel des Nährmediums trotz N-Mangel-Nährlösung immer unter dem Bezugswert der Vorkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lösung.

In der Kultur mit Saccharose und Natriumacetat als C-Quelle ist ein anfänglicher Rückgang von 1,6 mg pro Kulturschale (von 9,6 mg auf 8,0 mg) zu beobachten; bis zum Ende des Versuches steigt der Gesamtpetrolätherextrakt wieder auf 9,4 mg pro Kulturschale an. Am Rückgang des Petrolätherextraktes sind alle Lipidkomponenten beteiligt, ebenso am nachfolgenden geringen Anstieg.

Die Kultur mit Natriumacetat als einziger Kohlenstoffquelle zeichnet sich durch geringfügige Schwankungen in der Menge des Gesamtpetrolätherlöslichen aus, die innerhalb der natürlichen Variationsbreite liegen können.

In beiden Kulturen entspricht Rückgang und Anstieg des Petrolätherlöslichen auch den Änderungen bei den Triacylglycerinen, so daß deren prozentualer Gehalt im Petrolätherextrakt nicht wesentlich differiert (s. Tabellenanhang I, S. 105). Beide Kulturen zeichnen sich im Gegensatz zur Umpflanzkultur auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung mit Saccharose als C-Quelle durch einen erheblichen Anstieg des Anteils an freien Fettsäuren aus (s. Abb. 16a), der mit einem starken anfänglichen Rückgang der Diacylglycerine verbunden ist (s. Abb. 16b). Auch bei der oben angeführten Kultur mit Saccharose als C-Quelle sinkt nach der Umpflanzung der Gehalt an Diacylglycerinen, dort ist diese Erscheinung jedoch mit einem erheblichen Anwachsen der Triacylglycerine und einem Sinken der freien Fettsäuren verbunden (s. Abb. 16a-d). Bei N-Mangel und Saccharose als C-Quelle wird offensichtlich die Synthese der Triacylglycerine gefördert (Bildung dieser Verbindung aus freien Fettsäuren und Diacylglycerinen; s. auch Tabelle 17, N-Mangel-Aufzuchtulturen). Wenn Natriumacetat im Nährmedium vorhanden ist oder allein die Kohlenstoffquelle (außer Asparagin) darstellt, kann diese Synthese offensichtlich trotz N-Mangel nicht bevorzugt ablaufen.

Das verstärkte Auftreten der freien Fettsäuren könnte eine Folge von Abbaureaktionen sein, da ja bei Anwesenheit von Natriumacetat das Wachstum von *E. vernalis* stark gehemmt wird (Rückgang des Trockengewichtes trotz Saccharoseangebot in der Nährlösung). In einem weiteren Versuch ohne Kohlenstoffquelle nach dem Umpflanzen sollte deshalb geprüft werden, ob die Lipidfraktionen der Acetatkulturen einem Fettabbau nach Entzug der Kohlenstoffquelle entsprechen. Hieraus sollten sich eventuell Hinweise auf die Wirkung des Acetats im Nährmedium der Kulturen ergeben.

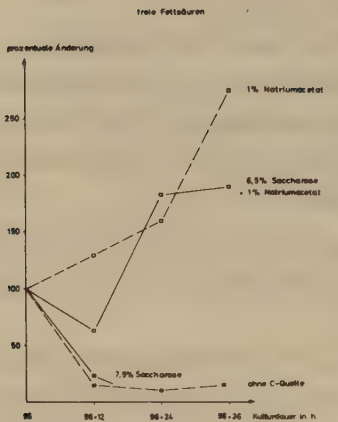


Abb. 16a

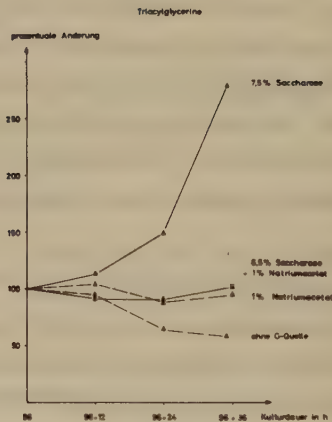


Abb. 16c

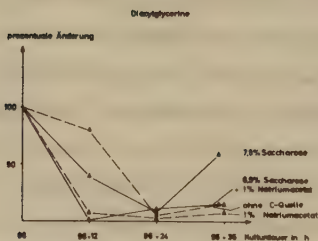


Abb. 16b

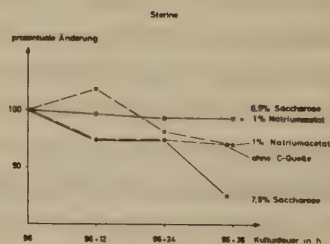


Abb. 16d

Abb. 16 a-d:

Prozentuale Änderung der Lipidkomponenten von Umpflanzkulturen von *E. vernalis*; Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. mit verschiedenen Kohlenstoffquellen:

- I: 7,5 % Saccharose (geschlossene Symbole, durchgehende Linie),
- II: 6,5 % Saccharose + 1 % Natriumacetat (offene Symbole, durchgehende Linie),
- III: 1 % Natriumacetat (offene Symbole, unterbrochene Linie),
- IV: keine C-Quelle (geschlossene Symbole, unterbrochene Linie).

a) freie Fettsäuren; b) Diacylglycerine; c) Triacylglycerine; d) Sterine.

Die Analysenwerte geben die prozentuale Veränderung gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung (= 100 %) an.

Versuchsansatz (9):

E. vernalis wurde auf Oberflächenkulturen in 1/1 N-WÖLTJE-Lösung 96 h vor-
kultiviert, anschließend auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung, die keine Saccharose enthielt,
umgepflanzt und nach 12, 24 und 35 h geerntet. Die petrolätherlöslichen Lipide
wurden nach der Gefriertrocknungsmethode gewonnen. Die Ergebnisse dieses Ver-
suchsansatzes sind in Tabelle 23 zusammengestellt.

Tabelle 23: Trockengewicht, Petrolätherlösliches und Lipidkomponenten der Um-
pflanzkultur von *E. vernalis*; Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.,
nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. ohne Kohlenstoffquelle.
(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine,
StE = Sterinfettsäureester)

		Kontrolle	Kulturdauer in h nach dem Umpflanzen		
			12	24	35
Trockengew. in mg		300	277	253	255
Petrolätherextr. in mg (% vom Trocken- gewicht)		15,0 (5,0)	13,5 (4,9)	8,6 (3,4)	7,9 (3,1)
Lipidkomponenten (% v. Trockengew.)	DAG	1,0 (0,33)	0,8 (0,3)	0,06 (0,02)	0,15 (0,06)
	St	0,4 (0,13)	0,3 (0,1)	0,3 (0,1)	0,28 (0,1)
	Fs	0,4 (0,13)	0,06 (0,02)	0,04 (0,02)	0,06 (0,02)
	TAG	13,0 (4,3)	12,3 (4,4)	8,2 (3,24)	7,4 (2,9)
	StE	0,2 (0,07)	Spur	Spur	Spur

Aus Tabelle 23 ist ersichtlich, daß bei Abwesenheit jeglicher C-Quelle (außer Aspa-
ragin) die Veränderungen bezüglich der petrolätherlöslichen Lipide und des Trocken-
gewichtes gegenüber den Acetatkulturen differieren. Ohne Kohlenstoffquelle fand ein
erheblicher Lipidabbau statt (am Ende der Kulturreihe sind nur noch 53 % der ur-
sprünglichen Menge vorhanden). Das Trockengewicht verringerte sich wesentlich
weniger, nach 35 h lag der Wert nur 15 % unter dem Bezugswert, in den Acetatkul-
turen jedoch 26 bzw. 30 %.

Die einzelnen Komponenten des Petrolätherextraktes zeigten mit Ausnahme der Triacylglycerine im Kulturverlauf ein ähnliches Bild wie die entsprechenden Fraktionen bei der Umpflanzkultur auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung mit vollständiger Saccharosemenge (s. Abb. 16 a-d). Diacylglycerine und freie Fettsäuren fallen deutlich ab (von 0,4 mg pro Kulturschale zum Zeitpunkt der Umpflanzung auf 0,06 mg 35 h später, bei den freien Säuren und bei den Diacylglycerinen von 1,0 mg auf 0,15 mg pro Kulturschale). Der Rückgang der Triacylglycerine um 43 % vom Ausgangswert bildet entsprechend der Größenordnung des Vorkommens einen wesentlichen Faktor bei der Abnahme der petrolätherlöslichen Lipide.

Aus diesem Ergebnis, daß nämlich innerhalb der hier untersuchten Kulturzeiten beim Abbau der Lipide nicht verstärkt freie Fettsäuren gebildet werden, ist zu schließen, daß Acetat offensichtlich direkt in den Biosyntheseweg der petrolätherlöslichen Lipide eingreift. Ausgenommen sind aber die Sterine, denn diese sind in den vorkommenden Mengen sowohl bei Acetat in der Nährlösung als auch bei Entzug der Kohlenstoffquelle nur wenig verändert, bei N-Mangel und Saccharose als C-Quelle werden sie aber offensichtlich weniger stark synthetisiert oder verstärkt abgebaut (s. Abb. 16d und N-Mangel-Aufzuchtulturen, S. 76 und S. 61).

Ob jedoch das Acetat bereits die Bereitstellung von Glycerin-3-phosphat hemmt oder in den Reaktionsmechanismus der Acyltransferasen bei der Bildung der Acylglycerine eingreift, oder ob das Acetat das Rückkopplungssystem der Acetyl-CoA-Carboxylase blockiert, kann aufgrund dieser Versuche nicht geklärt werden und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Die Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von H. RAAF (1941) und R. KLEMM (1961), daß *E. vernalis* nicht auf Acetat als C-Quelle wachsen kann, und geben darüberhinaus einen deutlichen Anhaltspunkt dafür, daß Essigsäure die Synthese bzw. den Abbau der petrolätherlöslichen Lipide beeinflusst. Eine vermehrte Fettbildung durch Zugabe von Natriumacetat zum Nährmedium (H. HAEHN und W. KINTTOF, 1925) konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Acetatkulturen von *T. utilis* (Versuchsansatz 7 und 8) bezüglich der quantitativen Auftrennung der petrolätherlöslichen Lipide sind in Tabelle 24 zusammengestellt.

Tabelle 24: Trockengewicht, Petrolätherlösliches und Lipidkomponenten der Umpflanzkulturen von *T. utilis*; Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/2 N-WÖLTJE-Lsg. mit 6,5 % Saccharose und 1 % Natriumacetat, bzw. 1 % Natriumacetat als Kohlenstoffquelle.
(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

		Kontrolle	Kulturdauer in h nach dem Umpflanzen		
			12	24	36
			Kohlenstoffquelle: 6,5 % Saccharose + 1 % Natriumacetat		
Trockengew. in mg		241	234	259	276
Petrolätherextr. in mg (% v. Trockengewicht)		6,6 (2,7)	6,3 (2,7)	7,6 (2,9)	6,1 (2,2)
Lipidkomponenten (% v. Trockengew.)	DAG	0,27 (0,11)	0,83 (0,35)	1,06 (0,41)	0,91 (0,33)
	St	0,43 (0,18)	0,35 (0,15)	0,42 (0,16)	0,28 (0,10)
	Fs	0,08 (0,03)	0,08 (0,03)	0,02 (0,01)	Spur
	TAG	5,38 (2,23)	4,74 (2,02)	5,75 (2,22)	4,59 (1,66)
	StE	0,39 (0,16)	0,30 (0,13)	0,35 (0,14)	0,31 (0,11)
			Kohlenstoffquelle: 1 % Natriumacetat		
Trockengew. in mg		241	220	264	265
Petrolätherextr. in mg (% v. Trockengewicht)		6,6 (2,7)	5,2 (2,4)	6,8 (2,6)	6,7 (2,5)
Lipidkomponenten (% v. Trockengew.)	DAG	0,27 (0,11)	0,93 (0,42)	0,59 (0,22)	0,68 (0,25)
	St	0,43 (0,18)	0,37 (0,17)	0,57 (0,22)	0,68 (0,25)
	Fs	0,08 (0,03)	Spur	0,06 (0,02)	0,09 (0,03)
	TAG	5,38 (2,23)	3,65 (1,66)	5,21 (1,97)	4,87 (1,84)
	StE	0,39 (0,16)	0,24 (0,11)	0,34 (0,13)	0,40 (0,15)

Das Wachstum von *T. utilis* wird durch eine zwar geringe aber signifikante Zunahme des Trockengewichtes in beiden Kulturansätzen deutlich (s. Tabelle 24). Der Gehalt an petrolätherlöslichen Lipiden ändert sich in geringem Rahmen, läßt aber keine klare Zunahme oder Abnahme im Kulturverlauf erkennen und ist somit als normale Streuung innerhalb der Kulturmethode zu betrachten. Die Analysen der Bestandteile des Petrolätherlöslichen zeigen Schwankungen, die sich wie die Änderungen des Gesamtpetrolätherextraktes in gewissen Grenzen halten, die keine Erklärungen erlauben. Eine Ausnahme davon bilden die Diacylglycerine. Diese treten in beiden Kulturen in erheblich größerer Menge (sowohl absolut als auch relativ vom Petrolätherextrakt) als in der Bezugskultur auf (s. Tabelle 24 und Abbildung 17).

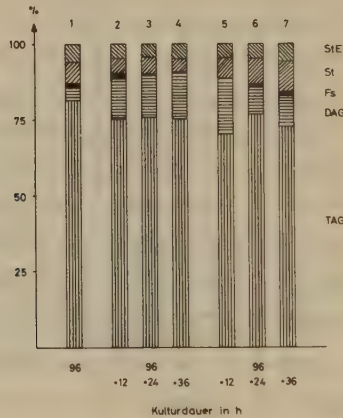


Abb. 17:

Prozentuale Verteilung der Lipidkomponenten von *T. utilis*; Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. (1), nach 96 h Umpflanzung auf 1/2 N-WÖLTJE-Lsg. mit 6,5 % Saccharose und 1 % Natriumacetat als Kohlenstoffquelle (2-4), Ernte nach 12 (2), 24 (3) und 36 (4) h; bzw. mit 1 % Natriumacetat als Kohlenstoffquelle (5-7), Ernte nach 12 (5), 24 (6) und 36 (7) h. Die Werte sind Prozentwerte vom Gesamtpetrolätherextrakt (= 100 %).

(StE (▨) = Sterinfettsäureester; St (▩) = Sterine, Fs (■) = Fettsäuren, DAG (▧) = Diacylglycerine, TAG (▤) = Triacylglycerine).

Weiterhin ist ein ständiges Ansteigen des Gehalts an Sterinen der Umpflanzkultur mit Acetat als einziger (außer Asparagin) C-Quelle zu beobachten.

T. utilis wächst also auf Acetat normal weiter, zeigt aber in den petrolätherlöslichen Lipiden einen erhöhten Anteil an Diacylglycerinen und teilweise (bei Acetat als einziger C-Quelle) an Sterinen. Daraus ist zu schließen, daß Acetat als Kohlenstoffquelle bei *T. utilis* zumindest in der Beeinflussung der Synthese einzelner Lipidkomponenten eine Rolle spielt.

b) Analyse der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten

Die Untersuchungen der Fettsäuren führten auch bei den Acetatkulturen zu den gleichen qualitativen Ergebnissen wie in allen vorangegangenen Versuchsansätzen. Im folgenden werden wieder die sieben Hauptkomponenten Stearin-, Öl-, Linol- und Linolensäure, Palmitin- und Palmitoleinsäure, sowie die kürzerkettigen Fettsäuren als Gesamtheit in ihrer Mengenverteilung dargestellt (Abb. 18 a-d, 19 a-d).

Für *E. vernalis* lagen die deutlichsten Unterschiede in der quantitativen Fettsäurezusammensetzung der Acetatkulturen gegenüber den Umpflanzkulturen auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung mit 7,5 % Saccharose und ohne Kohlenstoffquelle wieder bei den freien Säuren und den Sterinestern. In Abb. 18 a-d (freie Fettsäuren) und Abb. 19 a-d (Sterinester) sind die Entwicklungen in den verschiedenen Kulturreihen für diese beiden Lipidkomponenten gegenübergestellt.

Die freien Fettsäuren der Acetatkulturen, die in verstärktem Maße gebildet worden waren, zeichnen sich durch einen sehr hohen Gehalt an C_{18} -Säuren aus (zusammen über 90 % gegenüber nur 75 % in der Bezugskultur und maximal 85 % in der Umpflanzkultur auf 7,5 % Saccharose). Auch im Kulturverlauf ist noch eine geringe aber konstante Steigerung dieser Säuren zu beobachten (s. Abb. 18 a-d). Weiterhin ist ein deutlicher Rückgang der Palmitinsäure auf 5 bis 7 % gegenüber 20 % in der Bezugskultur und gegenüber dem Rückgang auf 12 % in der Umpflanzkultur mit Saccharose als C-Quelle zu erkennen. Die Umpflanzkultur auf Nährlösung ohne C-Quelle (Versuchsansatz 9) zeigte hingegen einen Rückgang der C_{18} -Fettsäuren (auf minimal 51 % 24 h nach dem Wechsel des Nährmediums) und ein starkes Anwachsen der kürzerkettigen Fettsäuren (auf maximal 35 % 24 h nach dem Umpflanzen). Bis auf die Triacylglycerine zeigten alle Komponenten dieses Kulturansatzes 24 h nach der Umpflanzung ein Maximum an kürzerkettigen Fettsäuren (s. Tabellenanhang II, Tabellen 23 bis 25). Hier überlagern sich offensichtlich Abbaureaktionen mit geringfügigen Neusynthesen (s. dazu Tabelle 23, S. 77).

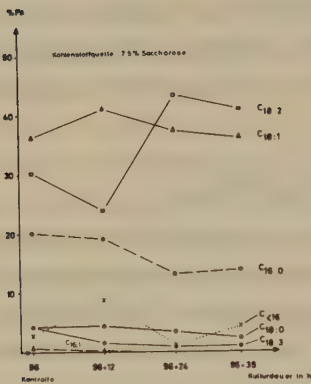


Abb. 18a

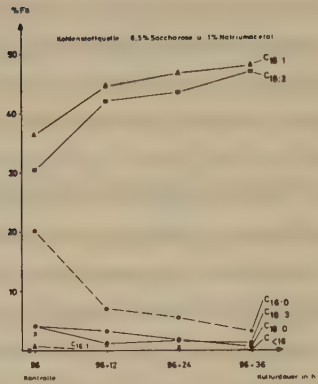


Abb. 18b

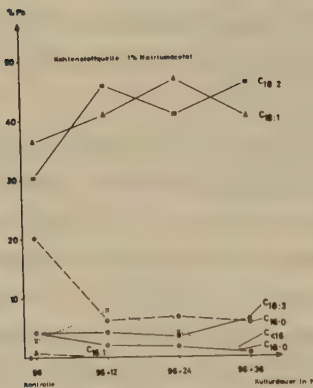


Abb. 18c

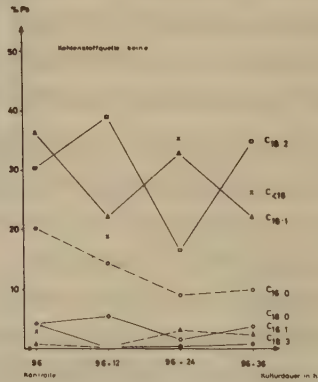


Abb. 18d

Abb. 18 a-d:

Prozentuale Verteilung der freien Fettsäuren von Umpflanzkulturen von *E. ver-nalis*; Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.

- a) 7,5 % Saccharose, b) 6,5 % Saccharose und 1 % Natriumacetat
c) 1 % Natriumacetat, d) keine Kohlenstoffquelle

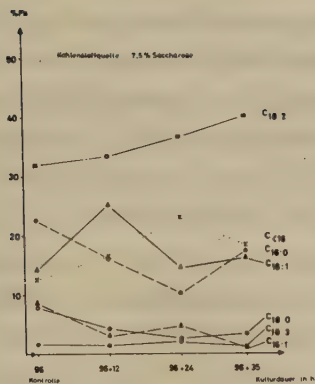


Abb. 19a

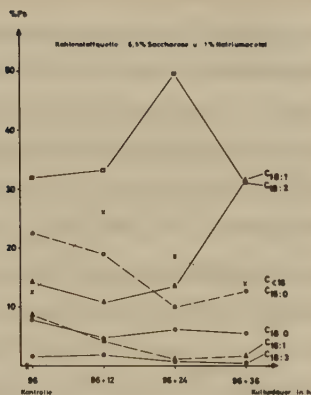


Abb. 19b

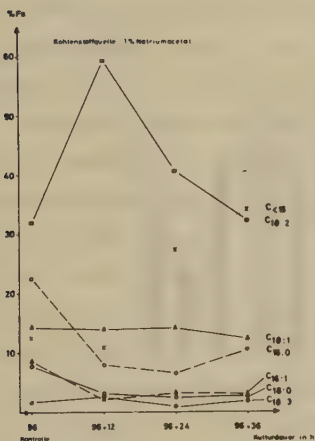


Abb. 19c

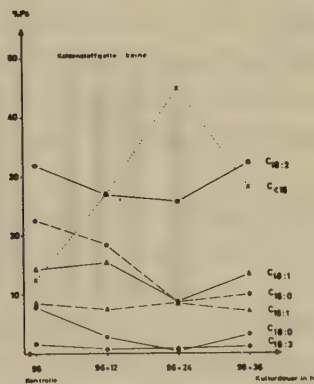


Abb. 19d

Abb. 19 a-d:

Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der Sterinester von Umpflanzkulturen von *E. vernalis*; Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.

- a) 7,5 % Saccharose, b) 6,5 % Saccharose + 1 % Natriumacetat,
c) 1 % Natriumacetat, d) keine Kohlenstoffquelle

Auch bei den Sterinestern (s. Abb. 19 a-d) ist in allen 4 Kulturansätzen gegenüber der Bezugskultur ein Absinken des Palmitinsäuregehaltes zu beobachten (s. auch Tabellenanhang II, Tab. 8-10 u. 17-25). Die Kultur mit Natriumacetat als einziger C-Quelle und die ohne C-Quelle in der Umpflanznährlösung lassen gegenüber den beiden anderen Umpflanzkulturen und der Bezugskultur einen erhöhten Anteil an kürzerkettigen Fettsäuren erkennen (Acetatkultur: 34 % nach 35 h, Umpflanzkultur ohne C-Quelle: 45 % nach 24 h; im Gegensatz dazu in der Bezugskultur: 12,5 %).

Die in allen vorangegangenen Kulturen beobachtete Tatsache, daß die 1,2-Diacylglycerine fast immer mindestens 10 % mehr Linolsäure enthalten als die 1,3-Diacylglycerine, läßt sich für die Acetatkulturen und auch für die Umpflanzkultur ohne Kohlenstoffquelle nicht allgemein bestätigen. Hier kommen auch etwa gleiche Mengen und teilweise sogar höhere Anteile an Linolsäure bei den 1,3-Diacylglycerinen vor (s. Abb. 20).

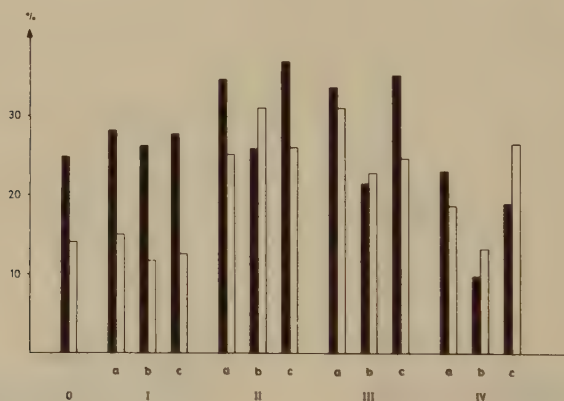


Abb. 20:

Prozentuale Anteile der Linolsäure bei 1,2- (■) und 1,3-Diacylglycerinen (□) (Gesamtfettsäuren der jeweiligen Komponenten = 100 %) von *E. vernalis*; Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. (0), nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. mit verschiedenen Kohlenstoffquellen;

I : 7,5 % Saccharose

II : 6,5 % Saccharose + 1 % Natriumacetat

III : 1 % Natriumacetat

IV : keine C-Quelle.

Ernte jeweils nach 12 (a), 24 (b) und 35 oder 36 (c) h.

Da *T. utilis* in den Acetatkulturen etwa gleich gut gewachsen waren und auch keine großen Unterschiede im Fettgehalt festgestellt wurden, soll nur die Verteilung der Fettsäuren der Lipidkomponenten in der reinen Acetatkultur beschrieben werden.

Die Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten der Acetatkulturen von *T. utilis* unterscheiden sich kaum von denen der Kontrollkultur (s. Tabellenanhang II, Tab. 35 bis 37). Mit fortschreitendem Kulturalter ist eine geringe aber konstante Zunahme der Linol- und Linolensäure bei den Sterinestern zu beobachten, wie dies bereits in Kulturansatz 1 beschrieben wurde. Deutliche N-Mangelsymptome (Zunahme der C_{16} -Säuren bei den freien Fettsäuren) sind hier während des Kulturverlaufs von 36 h auf 1/2 N-WÖLTJE-Lösung noch nicht zu beobachten.

5. Lipidbildung bei Submerskultur

Bis in die 40iger Jahre wurden zur Verfettung von Hefen nur Oberflächenkulturen verwendet (S. HEIDE, 1939; H. RAAF, 1941; K. L. SCHULZE, 1950). Für *E. vernalis* (H. FINK u. Mitarb., 1937) und *Oospora lactis* (H. GEFFERS, 1937) wurde diese Kulturmethode als Erfordernis für gutes Wachstum und gute Fettbildung angegeben. K. BERNHAUER u. Mitarb. (1948) erzielten auch unter submersen Kulturbedingungen für *E. vernalis* eine gute Fettbildung bei Stickstoffmangel in der Nährlösung.

T. utilis wurde in allen neueren Arbeiten submers kultiviert (P. S. S. DAWSON und M. CRAIG, 1966, 1970; D. BLOOMFIELD und K. BLOCH, 1958 u. a. m.; s. auch Einleitung, S. 1 f).

Es war deshalb von Interesse, ob sich bei Submerskulturen Substanz- und Fettproduktion sowie die quantitative Zusammensetzung der Lipidkomponenten gegenüber den Oberflächenkulturen entscheidend ändern. Außerdem sollte mit Hilfe der Submerskulturen die Fettbildung bei jüngeren Kulturen untersucht werden. In Anlehnung an die zitierte Literatur (s. oben und Einleitung, S. 1 f) wurde die Kultur mit Wuchsstoffzusatz gezogen.

Versuchsansatz(10):

Die 3 Tage auf Schrägagar vorgezogenen Versuchsorganismen wurden zur Gewinnung einer größeren Menge Impfmateriel 18 h in 20 ml 1/8 N-WÖLTJE-Lösung mit 13 µg Biotin/Ltr. als Schüttelkultur vorkultiviert. Anschließend wurden je 0,5 ml der Suspension in Petrischalen mit 14,5 ml der gleichen Nährlösung als Oberflächenkultur und je 8,5 ml in Rundkolben mit 250 ml dieser Nährlösung als Submerskultur weiter gezogen. Die Ernte erfolgte nach 48 h.

Zum direkten Vergleich der beiden Kulturbedingungen wurden alle gemessenen Werte auf 100 ml Nährlösung umgerechnet (s. Tabelle 25). Die Ergebnisse der Oberflächenkulturen wurden aus 5 Schalen ermittelt.

Tabelle 25: Keimzahl, Erntemenge, Trockengewicht und Gesamtpetrolätherextrakt von *E. vernalis* und *T. utilis* bei Oberflächen- und Submerskultur.
Nährmedium: 1/8 N-WÖLTJE-Lsg. mit 13 µg Biotin/Ltr.; Kulturdauer: 48 h. Die Analysendaten sind bezogen auf 100 ml Nährlösung.

Organismus	<i>E. vernalis</i>		<i>T. utilis</i>	
Kulturart	Oberflächenk.	Submersk.	Oberflächenk.	Submersk.
Keimzahl	$33,2 \cdot 10^5$		$154,4 \cdot 10^5$	
Ernte in ml	0,4	1,0	0,4	2,4
Trockengew. in mg	129	225	132	507
Petrolätherextr. in mg	13,0	21,9	10,5	27,8
in % v. Trockengew.	10,0	9,7	8,0	5,5

Auffallend ist es, daß die Menge Trockensubstanz bei *T. utilis* in der Submerskultur fast viermal so hoch liegt wie in der Oberflächenkultur, bei *E. vernalis* aber nur die doppelte Menge erreicht wird (s. Tab. 25). Der relative Fettgehalt lag bei *E. vernalis* in der Submerskultur nur geringfügig unter dem Wert der Oberflächenkultur. *T. utilis* zeigt in der Oberflächenkultur einen deutlich höheren relativen Fettgehalt, was zusammen mit der verstärkten Substanzproduktion darauf schließen läßt, daß *T. utilis* in der Submerskultur die besseren Wachstumsbedingungen vorfindet und sich ein N-Mangel für alle Zellen erst später einstellt (vgl. S. 64).

Nach F. MEYER und K. BLOCH (1963) bevorzugt *T. utilis* partiell anaerobe Wachstumsbedingungen, was die beschriebenen Beobachtungen bestätigen. Denn auch in gut belüfteten Submerskulturen wird der Organismus weniger mit Sauerstoff versorgt als in frischen Oberflächenkulturen.

Die Petrolätherextrakte der Submerskulturen von *E. vernalis* und *T. utilis* (s. Tab. 26) unterscheiden sich in ihrer quantitativen Zusammensetzung nicht grundsätzlich von denen der Oberflächenkulturen.

Tabelle 26: Lipidkomponenten von Submerskulturen von *E. vernalis* und *T. utilis*. Nährmedium: 1/8 N-WÖLTJ E-Lsg. mit 13 µg Biotin/Ltr.; Kulturdauer: 48 h.
(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

Organismus	<i>E. vernalis</i>		<i>T. utilis</i>	
Lipidkomponenten	mg/100 ml Nährlg.	% v. Petrol-ätherextrakt	mg/100 ml Nährlg.	% v. Petrol-ätherextrakt
DAG	0,3	1,4	2,6	9,4
St	0,45	2,0	1,9	6,8
Fs	0,36	1,6	1,2	4,3
TAG	20,8	94,0	19,9	71,6
StE	Spur	Spur	1,1	4,1

Die prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen (s. Tab. 26) sind bei den Submerskulturen von *T. utilis* dadurch ausgezeichnet, daß der Anteil der Triacylglycerine nur bei 71,5 % liegt, der der Diacylglycerine aber bei fast 10%; auch der Anteil der freien Sterine und besonders der der freien Fettsäuren (4,3 %) ist höher als bei den älteren vergleichbaren Oberflächenkulturen (s. Versuchsansatz 3), die Fraktion der Sterinester liegt allerdings niedriger. Weitere Submerskulturen dieses Organismus mit gleicher Kulturdauer aber einer höheren Gabe an Stickstoff lassen erkennen, daß zu Beginn des Stickstoffmangels die petrolätherlöslichen Bestandteile durch einen erheblich höheren Anteil an freien Fettsäuren gekennzeichnet sind (s. Tab. 27, S. 88).

Tabelle 27: Prozentuale Zusammensetzung des Petrolätherlöslichen der Submerskultur von *T. utilis*; Nährmedium: 1/2 N-WÖLTJE-Lsg.; Kulturdauer: 48 h.

(DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester)

Lipidkomponenten	DAG	St	Fs	TAG	StE
% vom Petroläther-extrakt	0,8	4,2	23,9	65,5	4,0

Bei *E. vernalis* lassen sich gegenüber der 96 h alten Oberflächenkultur auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung (s. Tab. 17, S. 61) größere Anteile an freien Fettsäuren (1,6 %) und Sterinen (2,4 %) feststellen gegenüber einer etwas geringeren Menge an Triacylglycerinen (s. Tab. 26). Der Anteil der Triacylglycerine liegt jedoch schon höher als der prozentuale Anteil bei Kulturen auf 1/1 N-WÖLTJE-Lösung.

Die Submerskulturen stellen also hinsichtlich der gebildeten Lipidmenge und deren Zusammensetzung einen Übergang zwischen N-Mangelkulturen und N-reich gezogenen Kulturen dar. Das ist einerseits wegen der kürzeren Kulturdauer, andererseits wegen der gleichmäßigen Versorgung aller Zellen mit dem noch vorhandenen Stickstoff auf einen später eintretenden tatsächlichen N-Mangel zurückzuführen.

Die Verteilung der Fettsäuren in den einzelnen Lipidgruppen bei der Submerskultur von *E. vernalis* mit 1/8 N-WÖLTJE-Lösung mit 13 µg Biotin/Ltr. läßt einerseits die Folgen der Stickstoffmangelbedingungen (s. Versuchsansatz 3, S. 62 f) und des Biotinzusatzes (s. S. 56 f) erkennen, andererseits zeigt sich durch die kürzere Kulturdauer, daß die als typisch herausgestellten Symptome (N-Mangel: steiler Anstieg der kürzerkettigen Fettsäuren bei freien Säuren und Sterinestern; Biotinwirkung: Vermehrung der C₁₈-Säuren) in abgeschwächter Form auftreten (s. Tabellenanhang II, Tab. 26 , S. 121).

Ein direkter Vergleich der Fettsäuren, die von *T. utilis* in Submerskultur gebildet werden, mit denen, die bei Oberflächenkulturen entstehen, ist nur bedingt möglich, da sich u. a. der Sauerstoffdruck in der Nährlösung direkt auf den Anteil ungesättigter Fettsäuren auswirkt (T. BABIJ u. Mitarb., 1969; C. M. BROWN und A. H. ROSE, 1969).

Trotz dieser Einschränkung ist die Tatsache bemerkenswert, daß bei beginnendem N-Mangel (Schüttelkultur in 1/1 N-, belüftete Submerskultur in 1/2 N-WÖLTJE-Lösung) der Anteil der Palmitoleinsäure mit 14 % (Palmitinsäure: 9 %, s. Tabellenanhang II, Tabelle 38 , S. 127) in der Fraktion der freien Fettsäuren, verglichen mit einer 4 Tage alten Oberflächenkultur auf der gleichen Nährlösung (1/2 N-WÖLTJE-Lösung) erheblich höher liegt (zum Vergleich: Palmitoleinsäure: 8 %, Palmitinsäure: 21 %).

Die beobachteten Unterschiede zwischen Oberflächen- und Submerskultur sind für *E. vernalis* nicht bedeutend; für *T. utilis* ist der Vergleich wegen des stark verschiedenen Wachstumsverhalten auf Submers- und Oberflächenkultur schwierig.

6. Mikroskopische Untersuchung zur beginnenden Neutrallipidbildung bei

E. vernalis

T. utilis bildet erst bei eintretendem N-Mangel Neutrallipide (P.S.S.DAWSON, 1970; s.S. 68). Der Hinweis, daß auch *E. vernalis* erst zu diesem Zeitpunkt Neutrallipide bildet, liegt bei den Umpflanzkulturen vor (S. 66). Um diesen Befund zu erhärten, wurden mit geringen Mengen an Impfmateriäl Submerskulturen angesetzt, die eine gleichmäßige Versorgung aller Zellen mit noch in der Nährlösung vorhandenem Stickstoff garantierten. Die Prüfung auf gebildetes Neutrallipid, das sich tröpfchenförmig abscheidet, wurde mikroskopisch durchgeführt (s. dazu S. HEIDE, 1939; K.L.SCHULZE, 1950; H.TARWIDOWA, 1938). Die Fett-Tröpfchen ließen sich mit Sudan III-Lösung im Frischmaterial anfärben; die Prüfung auf Aminogruppen in der Restnährlösung wurde mit Ninhydrin-Reagens (0,2 g Ninhydrin in 100 ml n-Butanol und 3 ml Eisessig; E.STAHL, 1967) durchgeführt.

Versuchsansatz (11):

Das 4 Tage auf Schrägagar vorkultivierte Mycel von *E. vernalis* wurde in Wasser suspendiert und in 3 Ansätzen in 1/1 N-WÖLTJE-Lösung submers kultiviert. Je nach Länge der Kulturzeit wurden verschiedene Mengen Nährlösung für die gleiche Menge Impfsuspension eingesetzt.

Nr.	Impfsuspension in ml	Nährlösung in ml	Kulturdauer in h
1	1	30	18
2	1	30 + 60	36
3	1	30 + 60 + 120	54

Die Mengen der Nährlösung waren so abgestimmt, daß für die Ansätze mit doppelter Kulturdauer die Menge der Nährlösung um die zweifache Ausgangsmenge vermehrt wurde.

In Abbildung 21 sind Zellformen mit den tröpfchenförmigen Lipiden von *F. vernalis* dargestellt (s. S. 91).

a) Die Zellen der Suspension sind gekennzeichnet durch reichlich vorkommende Lipidtröpfchen verschiedener Größe. Die Zellformen selbst unterscheiden sich sehr stark; abgestorbene, langfädige Zellen (zu erkennen an fehlendem Plasma) kommen neben sprossenden Zellen unterschiedlicher Größe vor (Abb. 21 a).

b) Nach 18 h Submerskultur in 1/1 N-WÖLTJE-Lösung sind deutlich von Lipidtröpfchen freie Zellen mit kleinen Vakuolen neben Zellformen mit größeren Zelltröpfchen und größeren Vakuolen zu beobachten; das Verhältnis "fettfreier" Zellen zu "fetthaltigen" Zellen beträgt etwa 5 : 2 (Abb. 21 b). Die Ninhydrin-Reaktion der Restnährlösung war positiv.

c) Nach 36 Kulturstunden treten nur noch ganz vereinzelt Zellen mit deutlichen Fett-Tröpfchen auf; die überwiegende Menge des Mycels wird von ovalen bis länglich-ovalen Zellen gebildet, die ein sehr feinkörniges, gleichmäßiges Plasma und kleine rundliche Vakuolen haben. Das Verhältnis von Fett-Tröpfchen-freien zu Fett-Tröpfchen-haltigen Zellen beträgt etwa 50 : 1 (Abb. 21 c). Die Ninhydrin-Reaktion der Restnährlösung war positiv.

d) Nach 54 h war die Ninhydrinreaktion der Restnährlösung nur noch sehr schwach positiv, d.h. die Stickstoffquelle war nahezu erschöpft. Die Vermehrung der Zellen war also nach dieser Zeit so stark gewesen, daß die eingesetzte Stickstoffmenge nicht mehr ausreichte.

Abb. 21a

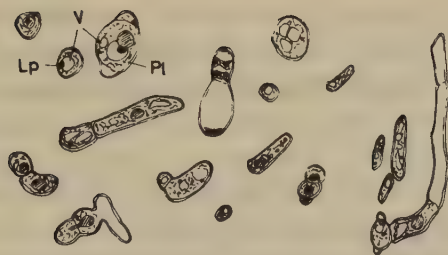


Abb. 21b

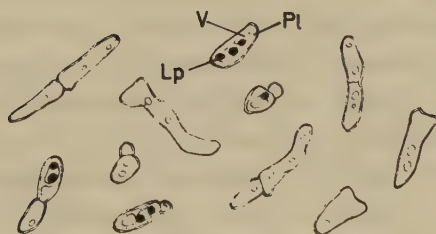


Abb. 21c

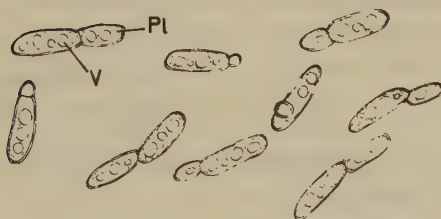


Abb. 21d



Abb. 21 a-d:

Zellformen und Lipidbildung bei *E. vernalis*; a) Impfsuspension der auf Schrägagar vorkultivierten Zellen; b-d) Submerskulturen in 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 18 (b), 36 (c) und 54 (d) h.

(Lp = Lipidtröpfchen, V = Vakuole, Pl = Plasma)

Das mikroskopische Bild zeigt noch überwiegend Fett-Tröpfchen-freie Zellen, aber eine beträchtliche Zahl zeichnet sich bereits durch kleine bis kleinste Lipidtröpfchen aus. Vereinzelt ist langfädiges Mycel zu beobachten und abgestorbene Zellen, die durch bereits von der Zellwand abgelöstes Plasma kenntlich sind (Abb. 21 d).

Diese Befunde bestätigten das Ergebnis der Umpflanzkulturen und lassen den Schluß zu, daß auch *E. vernalis* erst dann zur sichtbar starken Synthese von Reservefett schreitet, wenn die Stickstoffquelle der Nährlösung erschöpft ist.

D. Diskussion

Zur Fettbildung bei Stickstoffmangelernährung und bei alternenden Kulturen

Die Neutrallipidbildung tritt bei der Eiweißhefe *T. utilis* erst in dem Augenblick ein, in dem die Stickstoffquelle in der Nährlösung erschöpft ist (P.S.S.DAWSON, 1970). Auch die Fetthefe *E. vernalis* läßt sich bei ausreichender Stickstoffgabe frei von Reversefett, das sich in mikroskopisch sichtbaren Tröpfchen abscheidet, kultivieren, wie aus der Submerskultur (Versuchsansatz 11) mit 1/1 N-WÖLTJE-Lösung hervorgeht. Daraus ergibt sich, daß eine verstärkte Neutrallipidsynthese tatsächlich eine Ausweichreaktion darstellt, die dann eintritt, wenn mangels Substrat keine Stickstoffassimilation mehr erfolgen kann (vgl. S.HEIDE, 1939; M.STEINER, 1957 u.a.m.). Die Mengen der von *E. vernalis* gebildeten petrolätherlöslichen Lipide sind sowohl von der absoluten anfänglichen N-Gabe als auch von der Zeit, nach der die Stickstoffquelle in der Nährlösung erschöpft ist, abhängig.

So unterscheidet sich z.B. der Lipidgehalt junger Zellen, die auf geringen Stickstoffmengen (z.B. 1/4 N-WÖLTJE-Lösung) angesetzt wurden, vom Lipidgehalt älterer Zellen, die auf stickstoffreicher Nährlösung angesetzt und erst im Kulturverlauf allmählich N-Mangelbedingungen ausgesetzt waren (s. u.a. S.HEIDE, 1939; H.RAAF, 1941; M.STEINER und H.KATING, 1960; B.WITTER, 1974).

Die verschieden starke Lipidbildung unter variierten Kulturbedingungen ist gekoppelt mit einer quantitativ unterschiedlichen Zusammensetzung des Petrolätherlöslichen. Junge Kulturen von *E. vernalis*, die auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung angezogen wurden, zeichnen sich durch einen sehr hohen Gehalt an Triacylglycerinen (98 % vom Petrolätherextrakt) und einen sehr niedrigen an freien Fettsäuren (Spuren), sowie Sterinen (0,4 % vom Petrolätherextrakt) aus. Ältere Kulturen (Anzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lösung) zeigen gegenüber den jüngeren stickstoffreichen Kulturen eine Zunahme aller Lipidkomponenten.

Der prozentuale Anteil der Triacylglycerine vom Petrolätherextrakt ist bei den älteren Kulturen jedoch geringer (81 % gegenüber 86 % in der jüngeren Kultur). Bei weiterer Alterung (12 Tage Kulturdauer) und einem Rückgang des absoluten Fettgehaltes durch Autolyseerscheinungen werden die Sterine am wenigsten angegriffen, so daß der prozentuale Anteil am Petrolätherextrakt einen relativ hohen Wert (6,3 %, im Vergleich 4,8 % nach 4 Tagen) annimmt.

In den Umpflanzkulturen wird die Wirkung des N-Mangels auf die Sterinsynthese besonders deutlich. Nach dem Umpflanzen der N-arm vorgezogenen Kulturen auf neue Nährlösung tritt sofort eine erhöhte Synthese der Sterine ein (s. Abb. 14, S. 69).

Auch bei *T. utilis* sind diese Unterschiede in der Zusammensetzung der petrol-ätherlöslichen Lipide zu beobachten, je nachdem, ob der N-Mangel früh eintritt oder sich erst im Laufe der Kulturdauer einstellt. Junge N-Mangelkulturen zeigen ein deutlich vermehrtes Auftreten der Sterinester (13,4 % vom Petrolätherextrakt), bei alternden Kulturen tritt dies weniger in Erscheinung (3,8 % nach 6 Tagen, 8,7 % nach 12 Tagen Kulturdauer).

Es lassen sich also bei beiden Versuchsorganismen Unterschiede in der Lipidzusammensetzung feststellen, je nach dem Zeitpunkt, zu dem der N-Mangel eintritt. Da die Organismen außerdem verschieden auf den einsetzenden Stickstoffmangel reagieren, ist anzunehmen, daß bei der Fetthefe und der Eiweißhefe die Stoffwechselaktivitäten bei N-Mangel unterschiedlich sind.

Zum Einfluß von Vitaminen auf die Fettbildung

Auch wenn *T. utilis* und *E. vernalis* Biotin selbst synthetisieren (W.S.CHANG und W.H.PETERSON, 1949; H.C.YANG u. Mitarb., 1970), so ruft ein Zusatz dieses Vitamins zur Nährlösung bei beiden Organismen doch eine verstärkte Lipidsynthese hervor. Unter dem Aspekt, daß erst dann Neutrallipid gebildet wird, wenn die N-Quelle in der Nährlösung erschöpft ist, muß Biotin die Synthese der petrolätherlöslichen Verbindungen direkt fördern, denn ein allgemein angeregtes Wachstum und damit ein schnellerer Verbrauch der N-Quelle hätte auch eine erhöhte Substanzproduktion zur Folge, die aber bis zu einer Kulturdauer von 96 h ausblieb. Die Zunahme der petrolätherlöslichen Lipide ist bei *T. utilis* beschränkt auf vermehrte Bildung von Di- und Triacylglycerinen, bei *E. vernalis* werden jedoch mehr Sterine, Sterinester und besonders verstärkt Triacylglycerine gebildet.

Der Einfluß des Biotins auf die Acylglycerinsynthese beruht vermutlich auf einer bereits in jungen Zellen induzierten Synthese der Fettsäuren, und zwar dadurch, daß frühzeitig Acetyl-CoA-Carboxylase gebildet wird. Dieses wird durch Aufnahme des Biotins aus der Nährlösung von *E. vernalis* (s. dazu H.C.YANG u. Mitarb., 1969) bzw. durch Anregung der zelleigenen Biotinsynthese bei *T. utilis* (s. auch A.J.A.KERÄNEN, 1969) erreicht.

Die Förderung der Acylglycerinsynthese erfolgt indirekt über die Anregung der Fettsäuresynthese und den dadurch ausgelösten Regulationsmechanismus zur Entfernung überschüssiger Mengen an freien Fettsäuren (P.KARLSON, 1974; s.auch S. 59).

E. vernalis scheint jedoch eine wesentlich größere Fähigkeit zu besitzen, Triacylglycerine zu bilden, als *T. utilis*. Offensichtlich erfolgt die Regulierung der Fettsäuresynthese bei diesem Organismus auch durch verstärkte Bildung von Palmitin- und Palmitoleinsäure, die in Form ihrer CoA-Bindung die Fettsäuresynthese (D.WHITE und H.P.KLEIN, 1966) bzw. das Biotinenzym (P.KARLSON, 1974) hemmen; es kommt daher nicht zu einer Bildung großer Mengen an Reservefett. Eine Bestätigung dieser Annahme ist in der Tatsache zu sehen, daß in den Kultursätzen, die bei *E. vernalis* zu erheblich verstärkter Bildung von Triacylglycerinen führten (N-Mangel-, Biotin- und Biotin + Aneurin-Kulturen), bei *T. utilis* ein erhöhter Anteil an C_{16} -Säuren in der Fraktion der freien Säuren auftrat. Eine Ausnahme hiervon bildete lediglich die 96 h alte Kultur mit Biotin + Aneurin-Zusatz zum Nährmedium, in der *E. vernalis* zwar erhöhte Triacylglycerinsynthese, *T. utilis* aber gegenüber der vitaminfreien Kultur keine Erhöhung der C_{16} -Säuren zeigte (vgl. S. 52 und S. 58).

Bei Zusatz von Biotin und Aneurin wurde für *C. reukaufii* eine maximale Fettproduktion nachgewiesen (H.H.MARTIN, 1954). Auch *T. utilis* und *E. vernalis* lassen durch Zusatz dieser beiden Vitamine eine weitere Steigerung der Lipidsynthese erkennen. *E. vernalis* zeigt jedoch zusätzlich eine erhöhte Trockensubstanzproduktion, womit gegebenenfalls eine frühere Erschöpfung der N-Quelle verbunden ist und zusätzlich auch aus diesem Grund der Gehalt der petrolätherlöslichen Lipide gestiegen sein kann. Wie in der Biotinkultur ist auch hier die Synthese der Sterine, Sterinester und besonders der Triacylglycerine, gefördert. *T. utilis* hingegen läßt keine erhöhte Trockensubstanzproduktion erkennen. Die Steigerung der petrolätherlöslichen Lipide betrifft alle Komponenten, so daß für *T. utilis* bei Zusatz dieser beiden Vitamine (Biotin + Aneurin) eine allgemeine Anregung der Lipidsynthese stattgefunden haben muß.

Bemerkenswert ist auch die Tatsache, daß bei Zusatz von Biotin sowie Biotin und Aneurin zum Nährmedium das Wachstum und die Lipidsynthese auch bei *T. utilis* über 96 h hinaus gesteigert werden kann. Die vitaminfreien Kulturen zeigen nämlich für *E. vernalis* fortschreitendes Wachstum und gesteigerte Lipidproduktion bis 144 h Kulturdauer, während für *T. utilis* das Maximum bereits nach 96 h erreicht ist.

Zur Fettbildung bei Acetat als Kohlenstoffquelle

Die Ergebnisse von H. RAAF (1941) und R. KLEMM (1961), daß *E. vernalis* nicht auf Acetat als einziger C-Quelle wachsen kann, wurden bestätigt; darüberhinaus auch die von R. KLEMM (1961) beobachtete Tatsache, daß selbst bei nur partiellem Ersatz der Saccharose durch Natriumacetat kein Wachstum stattfindet. Eine erhöhte Bildung von petrolätherlöslichen Lipiden, wie sie von H. HAEHN und W. KINTTOF (1925) beschrieben wurde, konnte unter unseren Versuchsbedingungen nicht festgestellt werden.

T. utilis hingegen läßt durch geringe, aber signifikante Zunahme des Trockengewichtes ein Wachstum auf Natriumacetat erkennen (s. auch H. FINK u. Mitarb., 1937; weitere Literatur s. S. 73), ohne daß eine gesteigerte Produktion der petrolätherlöslichen Lipide festzustellen ist. Ein Einfluß des Acetats auf die Lipidsynthese ist jedoch für beide Organismen offensichtlich, und zwar dadurch, daß die prozentuale Zusammensetzung der Petrolätherextrakte durch besonders vermehrtes Auftreten der freien Fettsäuren (8,4 % vom Petrolätherextrakt nach 36 h auf Natriumacetat als einziger C-Quelle, gegenüber 2,8 % in der Kontrolle) bei *E. vernalis* und der Diacylglycerine bei *T. utilis* (14,9 % vom Petrolätherextrakt nach 36 h Kultur auf Natriumacetat als Zusatz zur Saccharose, gegenüber 4,1 % in der Kontrolle) verändert ist.

Die Wirkung des Acetats auf die Lipidsynthese ist also für beide Organismen verschieden. Vielleicht liegt schon in der Aufnahme des Acetats ein Unterschied, denn es besteht die Möglichkeit, das Acetat nach der Aktivierung durch Acetyl-CoA-Synthetase direkt in die Fettsäure- oder Sterinsynthese einzuschleusen oder über den Glyoxylsäure- oder den Zitronensäurezyklus Oxalacetat zu synthetisieren (P. KARLSON, 1974), so daß eventuell Gluconeogenese eintreten kann (K. HUNTER und A. H. ROSE, 1971).

Fütterungsversuche mit radioaktiv markiertem Acetat könnten Aufschluß über verschiedene Wege dieser Verbindung in den Versuchsorganismen geben.

Die Tatsache, daß *E. vernalis* auch mit Saccharose und Acetat als Kohlenstoffquelle Substanzverlust erleidet, deutet darauf hin, daß Acetat eine hemmende Wirkung auf das Wachstum ausübt. Da bei vollständigem Entzug der Kohlenstoffquelle das Trockengewicht dieses Organismus weniger stark abnimmt als bei Acetat in der Nährlösung, der Fettgehalt in letzterem Falle jedoch umso stärker, muß das Acetat einen aktiven Einfluß auf die Stoffwechselvorgänge von *E. vernalis* haben und nicht nur die Aufnahme der Saccharose hemmen (s. auch S. 78).

Zum Wachstum und zur Fettbildung bei Submerskulturen

Die praktisch gleichen Ergebnisse hinsichtlich Wachstum und Lipidbildung werden bei *E. vernalis* (im Vergleich zu den Oberflächenkulturverfahren) auch bei Submerskulturen erreicht (s. auch K. BERNHAUER u. Mitarb., 1948). *T. utilis* wächst in Submerskulturen aber wesentlich besser als auf Oberflächenkulturen (Trockengewicht pro 100 ml Nährlösung: Oberflächenkultur: 132 mg; Submerskultur: 507 mg). Nach F. MEYER und K. BLOCH (1963) bevorzugt *T. utilis* sogar partiell anaerobes Milieu. Das entspricht unseren Beobachtungen bei Oberflächen- und Submerskulturen. Die Änderungen in der Lipidzusammensetzung bei Submerskulturen gegenüber älteren Oberflächenkulturen sind nach den vorliegenden Ergebnissen mit einer kürzeren Kulturdauer und der gleichmäßigen Versorgung aller Zellen mit dem vorhandenen Stickstoff und damit später eintretendem N-Mangel leicht in Einklang zu bringen. Sie bestehen im wesentlichen darin, daß zunächst noch größere prozentuale Anteile freier Fettsäuren (1,6 % gegenüber Spuren in der N-Mangel-Oberflächenkultur von *E. vernalis* ; 4,3 % gegenüber 0,6 % bei *T. utilis*) trotz sehr geringer Stickstoffgabe (1/8 N-WÖLTJE-Lösung) vorhanden waren. Bei *T. utilis* war auch noch nicht der starke Anstieg der Sterinester (4,1 % gegenüber 13,4 % in der Oberflächenkultur) zu beobachten.

Zur Änderung der Fettsäuren in den Lipidkomponenten

Die Anknüpfung der freien Fettsäuren an Glycerin-3-phosphat, die zunächst zur Bildung der Lysophosphatidsäure (N.J.KUHN und F.LYNEN, 1965) und dann zur Bildung der Phosphatidsäure (Diacylglycerinphosphat) führt, erfolgt mit statistischer Verteilung durch ein Enzym, das nicht auf besondere Kettenlängen der Fettsäuren spezialisiert ist (P.KARLSON, 1974). Da aber entsprechend unseren Beobachtungen die Verteilung der Fettsäuren bei *E. vernalis* und *T. utilis* nicht in allen Lipidgruppen die gleiche ist und sich auch in den verschiedenen Kulturen unterschiedlich ändert, müssen die Fettsäuren noch nach der Bindung in Acylglycerinen und Sterinfettsäureestern verändert werden. B.TALAMO u.Mitarb. (1973) beschreiben die Bildung von Linoleyl-Phospholipid aus Oleyl-Phospholipid in *T. utilis* und diskutieren die möglichen Reaktionswege dieses Vorganges. Für diese Umwandlung wird keine endgültige Erklärung gefunden. Bei genauen Untersuchungen der Enzymsysteme müßte sich dieses Problem und z.B. auch die Erscheinung klären lassen, daß die 1,2-Diacylglycerine von *E. vernalis* fast immer einen um 10 % höheren Anteil an Linolsäure haben als die 1,3-Diacyl- und die Triacylglycerine. Eine Ausnahme bildeten die Fettsäuren der 1,2-Diacylglycerine der Umpfanzkultur auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung ohne Kohlenstoffquelle und mit Acetat als C-Quelle, in denen die 1,2-Diacylglycerine teilweise weniger Linolsäure enthielten als die anderen Acylglycerine.

Eine weitere noch nicht geklärte Beobachtung ist die Tatsache, daß *E. vernalis* in N-Mangelkulturen verstärkt kürzerkettige Fettsäuren bildet. Diese treten jedoch nur in den Fraktionen der freien Säuren und der Sterinester auf. In wieweit die bei N-Mangel vermindert vorkommenden Mengen an Pyridinnucleotiden (NAD und NADP, bzw. deren reduzierte Formen; s. G.DREPHAL, 1969) eine Rolle spielen und warum die kürzerkettigen Fettsäuren bei den Acylglycerinen nicht verstärkt auftreten, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Die Synthese ungesättigter Fettsäuren erfolgt bei Hefen durch nachträgliche Bildung der Doppelbindungen (K.BLOCH u.Mitarb., 1961). Die Synthese von Öl-, Linol- und Linolensäure erfolgt bei *T. utilis* über einen Oxidationsvorgang aus Stearinsäure, der molekularen Sauerstoff erfordert und nicht einer einfachen Dehydrierung entspricht (K.BLOCH u.Mitarb., 1961; C.YUAN u. K.BLOCH, 1961).

Diese Tatsache könnte die Zunahme höher ungesättigter Fettsäuren mit steigendem Kulturalter erklären. Auch *E. vernalis* zeigt bei fortschreitendem Kulturalter eine Vermehrung höher ungesättigter Säuren. Für diesen Organismus ist deshalb ebenfalls ein oxidativer Syntheseweg der ungesättigten Fettsäuren wahrscheinlich.

F. Zusammenfassung

1.) Zum Aufschluß der Zellen von *E. vernalis* und *T. utilis* sind zwei Aufschlußverfahren geeignet:

- a) Aufschluß durch Verreiben mit Kieselgur nach Gefriertrocknung der Zellen,
- b) Aufschluß mit der Kugelmühle, speziell für *T. utilis* .

Für beide Organismen wurde der Aufschluß durch Verreiben mit Kieselgur durchgeführt.

2.) Für die Gehaltsbestimmung der Lipidkomponenten der Petrolätherextrakte wurde ein Verfahren entwickelt, das die Analyse aller Komponenten auf einer Dünnschichtplatte nach Verkohlen mit Chromschwefelsäure erlaubte.

3.) Die Zusammensetzung der Neutrallipide von *E. vernalis* und *T. utilis* wurde bei verschiedenen Kulturbedingungen qualitativ und quantitativ untersucht. Die qualitativen Untersuchungen führten in allen Kulturen beider Organismen zu den gleichen Ergebnissen: Als Lipidkomponenten wurden 1,2-Diacyl-, 1,3-Diacylglycerine, Sterine, freie Fettsäuren, Triacylglycerine und Sterinfettsäureester gefunden; in Spuren wurden auch Monoacylglycerine nachgewiesen.

4.) Die Neutrallipidbildung setzt bei beiden Organismen erst dann ein, wenn die Stickstoffquelle der Nährlösung erschöpft ist. Die quantitative Zusammensetzung der Lipidkomponenten ist von dem Kulturzeitpunkt abhängig, zu dem der N-Mangel eintritt.

5.) Mit steigendem Alter der Kultur nehmen bei *E. vernalis* zunächst alle Lipidkomponenten relativ gleichmäßig zu. Nach 12 Kulturtagen liegen aber die Werte aller Fraktionen, bis auf die der Sterine, unter den Werten der 4 Tage alten Kultur. Bei *T. utilis* ist die geringe Zunahme des Gesamtpetrolätherextraktes nach 6 Tagen beschränkt auf eine Steigerung der Triacylglycerine. Nach 12 Kulturtagen haben nur die Sterinester einen höheren Wert als nach 4 Tagen Kulturdauer, die Werte aller anderen Komponenten liegen darunter.

Mit dem Alter der Kultur nimmt bei *E. vernalis* in allen Fraktionen außer den freien Fettsäuren, der Anteil der C_{18} -Säuren und der höher ungesättigten Säuren zu. Das Verhältnis von C_{18} - zu C_{16} -Säuren ändert sich in dieser Kulturreihe bei den freien Säuren praktisch nicht. Bei *T. utilis* sind die stärksten Änderungen der Zusammensetzung der Fettsäuren jedoch bei den freien Säuren zu beobachten.

6.) Junge N-Mangelkulturen haben bei *E. vernalis* einen extrem hohen Gehalt an Triacylglycerinen (98 % des Petrolätherlöslichen), bei *T. utilis* ist der Anteil der Sterinester stark erhöht (13,4 %). Die Zusammensetzung der Fettsäuren von *E. vernalis* ist durch einen hohen Anteil (über 40 %) an kürzerkettigen Fettsäuren bei den freien Fettsäuren und den Sterinestern gekennzeichnet, die Fettsäure-Zusammensetzung von *T. utilis* durch ein erhöhtes Auftreten von C_{16} -Säuren.

7.) Der Zusatz von Biotin zum Nährmedium bewirkt bei beiden Organismen eine Steigerung des Lipidgehaltes bei unverändertem Trockengewicht. Die Zunahme der petrolätherlöslichen Lipide erfolgt bei *E. vernalis* durch vermehrte Synthese von Sterinen, deren Estern und Triacylglycerinen, bei *T. utilis* durch Erhöhung des Diacyl- und Triacylglyceringehaltes. Bei einer Kulturdauer von 6 Tagen tritt auch für *T. utilis* weitere Erhöhung des Petrolätherlöslichen und eine Zunahme des Trockengewichtes ein. Die Fettsäuren der Lipidkomponenten von *E. vernalis* sind bei Vitaminzusatz allgemein durch ein verstärktes Auftreten der C_{18} -Säuren gekennzeichnet; bei *T. utilis* tritt bei den freien Fettsäuren und denen der Sterinester eine Zunahme der C_{16} -Säuren ein. Die Zusammensetzung der C_{18} -Säuren ändert sich bei den verschiedenen Komponenten unterschiedlich.

8.) Bei Zusatz von Biotin und Aneurin zum Nährmedium tritt eine weitere Steigerung des Petrolätherlöslichen ein. Bei *E. vernalis* ist diese mit einer Zunahme des Trockengewichtes verbunden, bei *T. utilis* ändert sich das Trockengewicht gegenüber der vitaminfreien Kultur nicht. Die Zunahme des Lipidgehaltes wird bei *E. vernalis* durch eine Steigerung der Sterine, Sterinester und Triacylglycerine bewirkt, bei *T. utilis* sind an der Zunahme alle Lipidkomponenten beteiligt. Die Änderung der Fettsäurezusammensetzung ist ähnlich wie bei Zusatz von Biotin allein.

9.) In Umpflanzkulturen von *E. vernalis* tritt beim Wechsel des Nährmediums von 1/1 N-WÖLTJE-Lösung erst nach 35 h Kulturdauer eine deutliche Zunahme des absoluten und relativen Gehaltes an petrolätherlöslichen Lipiden ein, die durch eine Vermehrung von Triacylglycerinen bewirkt ist. Beim Umpflanzen von 1/4 N-WÖLTJE-Lösung auf 1/1 N-WÖLTJE-Lösung ist ein deutlicher Rückgang des relativen Lipidgehaltes bei kaum verändertem Gesamtpetrolätherextrakt bis 24 h nach dem Umpflanzen zu beobachten; beim Umpflanzen von 1/1 N- auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung liegt nach 24 h der absolute Lipidgehalt deutlich über dem Kontrollwert.

Bei N-armer Vorzucht tritt nach dem Umpflanzen eine verstärkte Synthese der Sterine ein. Die Zunahme des absoluten Gehalts an petrolätherlöslichen Lipiden wird durch eine Steigerung des Triacylglycerinanteils hervorgerufen. Die Änderungen in der Zusammensetzung der Fettsäuren treten am deutlichsten bei den freien Fettsäuren und denen der Sterinester auf. Bei N-armer Vorzucht ist diese Änderung bei den freien Säuren nach 12 h Kulturdauer im wesentlichen abgeschlossen, bei den Sterinestern tritt sie in deutlicher Form bis 24 h nach dem Umpflanzen auf.

10.) Bei Umpflanzkulturen mit Natriumacetat in der 2. Nährlösung ist das Wachstum von *E. vernalis* gehemmt. Es tritt Trockensubstanzverlust ein; *T. utilis* wächst auf Natriumacetat normal weiter. Der Lipidgehalt ist unter diesen Kulturbedingungen bei *T. utilis* kaum verändert; bei *E. vernalis* zeigt sich trotz der N-Mangelbedingungen auch nach 36 h keine Erhöhung des absoluten Gehalts an petrolätherlöslichen Verbindungen. Die Lipidkomponenten von *E. vernalis* zeichnen sich durch eine starke Erhöhung des Anteils an freien Fettsäuren aus, die Menge der Diacylglycerine nimmt dagegen erheblich ab. Bei *T. utilis* liegen die Verhältnisse genau umgekehrt: Die freien Fettsäuren kommen vermindert vor, die Diacylglycerine sind stark erhöht.

Deutliche Änderungen der Fettsäurezusammensetzung für *E. vernalis* sind bei den freien Säuren und denen der Sterinester zu beobachten.

11.) Wird *E. vernalis* nach dem Umpflanzen von normaler 1/1 N-WÖLTJE-Lösung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lösung ohne Saccharose die Kohlenstoffquelle entzogen, tritt zwar Substanzverlust ein, der aber geringer ist als bei Natriumacetat in der Nährlösung.

Der Rückgang des Neutrallipids ist hierbei erheblich. Alle Lipidkomponenten sind davon betroffen, am wenigsten jedoch die Sterine. Das Auftreten großer Mengen an kürzerkettigen Fettsäuren charakterisiert bereits nach 24 h Kulturdauer die freien Fettsäuren und die Sterinester.

12.) Sowohl *E. vernalis* als auch *T. utilis* wachsen submers. Im Gegensatz zu *E. vernalis* zeigt *T. utilis* ein wesentlich stärkeres Wachstum in Submerskulturen als auf Oberflächenkulturen. Die Zusammensetzung der Lipidkomponenten und der Fettsäuren entspricht denen der Oberflächenkulturen mit den gleichen Nährmedien.

13.) Die Änderungen der Lipidkomponenten und der Fettsäuren der einzelnen Fraktionen bei der "Fetthefer" *E. vernalis* und der "Eiweißhefe" *T. utilis* unter den verschiedenen Kulturbedingungen werden diskutiert und soweit als möglich interpretiert.

F. Anhang

TABELLENANHANG I

Im Folgenden sind die Ergebnisse der quantitativen Verkohlungs-DC und die korrigierten Werte für Remissions- und Simultan-Messung aufgeführt.

In allen Tabellen sind die eingesetzten Mengen des Gesamtpetroläther-extraktes, die Mengen der über die Flächen bestimmten Einzelkomponenten, die Prozente von der eingesetzten Menge und die Summe der Prozente sowie die korrigierten Werte aller durchgeführten Analysen angegeben.

Die WÖLTJE-Nährlösungen werden durch Angabe der N-Menge charakterisiert; bei veränderter Kohlenstoffmenge ist diese angegeben; Umpflanzkulturen sind durch Bezeichnung von zwei WÖLTJE-Lösungen dargestellt.

Tabelle 1: Zur Messung eingesetzte Lipidmenge sowie gemessene und korrigierte Werte der Lipidkomponenten der Petrolätherextrakt in μg und in % von der eingesetzten Menge von *E. vernalis*; Meßmethode: Remissionsmessung.
(B = Biotin, A = Aneurin, S = Saccharose, NaAc = Natriumacetat, C = Kohlenstoffquelle, subm. = Submerskultur
DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester).

Analyse Nr.	WÖLTJE-Lösung	Kulturdauer in h	Eingesetzte Menge in μg	Gemessen					
				DAG	Lipidkomponenten in μg				Lipidkomponenten in %
					St	Fs	TAG	StE	DAG
1	1/1 N	96	74,6	6,2	2,5	2,5	77,1	0,9	8,3
2	1/1 N	144	106,6	11,1	6,7	6,2	113,8	2,3	10,3
3	1/1 N	288	73,0	3,2	5,1	Spur	72,3	1,1	4,4
4	1/1 N + B	96	79,3	2,6	3,0	0,3	95,2	1,9	3,3
5	1/1 N + B	144	121,0	3,4	2,8	3,6	135,0	3,5	2,8
6	1/1 N + B + A	96	77,7	1,5	4,5	0,1	98,9	1,8	1,9
7	1/4 N	96	105,0	1,7	0,6	Spur	152,0	0,5	1,6
8	1/1 N; 1/4 N	96 ; 12	124,6	3,7	3,6	0,9	154,6	Spur	3,0
12	1/4 N; 1/1 N	96 ; 12	135,1	2,4	1,5	1,7	151,0	Spur	1,8
13	1/4 N; 1/1 N	96 ; 24	136,1	2,6	2,1	2,1	157,0	Spur	1,9
14	1/4 N; 1/4 N	96 ; 6	117,3	2,1	1,6	0,9	130,0	Spur	1,8
15	1/4 N; 1/4 N	96 ; 12	80,7	1,7	1,5	Spur	93,0	Spur	2,1
16	1/4 N; 1/4 N	96 ; 24	82,65	1,1	1,3	0,1	111,7	Spur	1,3
17	1/1 N; 1/4 N 6,5% S + 1% NaAc	96 ; 12	106,2	0,3	4,2	2,8	125,2	Spur	0,3
18	"	96 ; 24	67,4	0,7	2,4	4,7	73,0	< 1	1,0
19	"	96 ; 36	75,4	1,0	2,6	5,2	87,0	Spur	1,3
20	1/1 N; 1/4 N 0% S + 1% NaAc	96 ; 12	75,4	0,6	3,4	3,7	92,6	Spur	0,8
21	"	96 ; 24	106,0	0,3	3,3	6,5	111,0	Spur	0,3
22	"	96 ; 36	69,8	0,7	2,5	9,7	101,0	< 1	1,0
23	1/1 N; 1/4 N ohne C	96 ; 12	107,6	8,7	3,6	0,7	135,8	Spur	8,1
24	"	96 ; 24	68,6	0,7	3,2	0,4	86,9	Spur	1,0
25	"	96 ; 35	104,7	2,6	4,7	1,0	125,7	Spur	2,5
26	1/8 N + B subm.	48	78,8	1,2	1,7	1,35	80,0	Spur	1,5

Werte					Korrigierte Werte									
Anteile in % v.d. einges. Menge				Summe der %	Lipidkomponenten in μg					Lipidkomponenten in % v. Petrolätherextr.				
Fs	TAG	StE			DAG	St	Fs	TAG	StE	DAG	St	Fs	TAG	StE
5	3,35	103,4	1,2	119,6	5,2	2,1	2,1	64,5	0,8	7,0	2,8	2,8	86,3	1,1
	5,8	107,0	2,16	131,6	8,4	5,1	4,7	86,5	1,7	7,9	4,8	4,7	81,3	1,7
	Spur	99,0	1,5	111,9	2,8	4,6	Spur	64,6	1,0	3,8	6,3	Spur	88,5	1,4
	0,4	120,0	2,4	129,9	2,0	2,3	0,2	73,3	1,5	2,5	2,9	0,3	92,4	1,9
	3,0	111,5	2,9	122,6	2,8	2,3	2,9	110,2	2,8	2,3	1,9	2,4	91,1	2,3
	0,1	127,3	2,3	137,4	1,1	3,3	0,07	72,0	1,3	1,4	4,2	0,1	92,6	1,7
	Spur	144,8	0,5	147,5	1,5	0,4	Spur	103,0	0,3	1,4	0,4	Spur	97,9	0,3
	0,7	124,0	Spur	130,6	2,8	2,7	0,2	118,4	Spur	2,2	2,2	0,6	95,0	Spur
	1,3	111,8	Spur	115,9	2,1	1,3	1,5	130,3	Spur	1,5	1,0	1,1	96,4	Spur
	1,5	115,5	Spur	120,2	2,2	1,7	1,7	130,6	Spur	1,6	1,2	1,2	95,9	Spur
	0,8	111,0	Spur	115,0	1,8	1,4	0,8	113,0	Spur	1,5	1,2	0,7	96,6	Spur
	Spur	115,2	Spur	119,2	1,4	1,3	Spur	78,0	Spur	1,7	1,6	Spur	96,6	Spur
	0,1	135,1	Spur	138,1	0,8	0,9	0,07	80,9	Spur	1,0	1,1	0,08	97,8	Spur
	2,6	117,9	Spur	124,8	0,2	3,4	2,2	100,3	Spur	0,2	3,2	2,1	94,4	Spur
	7,0	118,3	<1,5	121,4	0,6	2,0	3,9	60,1	<0,8	0,9	3,0	5,8	89,2	<1,1
	6,9	115,4	Spur	127,0	0,8	2,0	4,1	68,5	Spur	1,1	2,6	5,4	90,8	Spur
	4,9	122,8	Spur	133,0	0,45	2,6	2,8	69,6	Spur	0,5	3,4	3,7	92,3	Spur
	6,1	104,7	Spur	114,2	0,3	2,9	5,7	97,2	Spur	0,3	2,7	5,4	91,6	Spur
	13,9	144,7	<1,4	164,6	0,4	1,5	5,9	61,4	<0,6	0,6	2,1	8,4	87,9	<0,8
	0,7	126,2	Spur	138,3	6,2	2,6	0,5	98,2	Spur	5,8	2,4	0,5	91,3	Spur
	0,6	126,7	Spur	132,9	0,5	2,4	0,3	65,4	Spur	0,7	3,4	0,4	95,3	Spur
	0,9	120,0	Spur	127,9	2,0	3,7	0,8	98,3	Spur	1,9	3,5	0,7	93,8	Spur
	1,7	101,5	Spur	106,9	1,1	1,6	1,3	74,8	Spur	1,4	2,0	1,6	94,0	Spur

Tabelle 2: Zur Messung eingesetzte Lipidmenge sowie gemessene und korrigierte Werte der Lipidkomponenten der Petrolätherextrakte in μg und in % von der eingesetzten Menge von *E. vernalis*; Meßmethode: Simultanmessung.
(B = Biotin, A = Aneurin, S = Saccharose, NaAc = Natriumacetat, C = Kohlenstoffquelle, subm. = Submerskultur;
DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester).

Analyse Nr.	WÖLTJE-Lösung	Kulturdauer in h	Eingesetzte Menge in μg	Gemessene					
				Lipidkomponenten in μg					Lipidkomponenten
				DAG	St	Fs	TAG	StE	DAG
4	1/1 N + B	96	79,3	2,0	2,6	<0,3	124,0	<1	2,5
5	1/1 N + B	144	121,0	3,9	4,3	4,8	117,9	1,6	3,2
6	1/1 N + B + A	96	77,7	2,0	4,0	<1,4	143,0	<1,5	2,6
9	1/1 N ; 1/4 N	96 ; 24	78,4	0,6	1,7	-	120,5	-	0,8
10	1/1 N ; 1/4 N	96 ; 35	147,9	2,4	0,6	0,2	147,7	-	1,6
11	1/4 N ; 1/1 N	96 ; 6	124,3	6,0	1,2	-	142,1	-	4,8
12	1/4 N ; 1/1 N	96 ; 12	121,6	4,4	2,9	5,4	102,2	6,7	3,6
14	1/4 N ; 1/4 N	96 ; 6	117,3	2,5	0,9	1,1	145,2	-	2,1
15	1/4 N ; 1/4 N	96 ; 12	80,7	1,6	0,8	-	119,0	-	2,0
16	1/4 N ; 1/4 N	96 ; 24	82,7	1,7	0,5	-	125,6	-	2,0
17	1/1 N ; 1/4 N 6,5 % S + 1 % NaAc	96 ; 12	106,2	1,8	4,4	2,6	121,0	-	1,7
18	"	96 ; 24	67,4	2,0	5,1	2,6	106,7	-	3,0
19	"	96 ; 36	75,4	2,1	3,0	4,4	90,3	-	2,8
20	1/1 N ; 1/4 N 0 % S + 1 % NaAc	96 ; 12	75,4	1,6	3,3	3,3	96,0	0,8	2,1
21	"	96 ; 24	106,0	1,6	3,5	7,2	115,0	-	1,5
22	"	96 ; 36	69,8	2,1	0,5	7,9	122,4	-	3,0
24	1/1 N ; 1/4 N ohne C	96 ; 24	68,6	1,3	3,6	0,7	106,9	-	1,9
25	"	96 ; 35	104,7	3,0	4,8	1,2	133,1	0,7	2,9
26	1/8 N + B; subm.	48	78,8	1,3	0,8	-	86,0	0,3	1,6

Verte				Korrigierte Werte									
en in % v.d.einges. Menge			Summe der %	Lipidkomponenten in µg					Lipidkomponenten in % v. Petrolätherextr.				
Fs	TAG	StE		DAG	St	Fs	TAG	StE	DAG	St	Fs	TAG	StE
<0,4	156,0	<1,2	163,4	1,2	1,5	<0,1	75,7	<0,6	1,5	2,0	<0,2	95,3	<0,7
4,0	97,0	1,3	109,1	3,5	3,9	4,3	108,1	1,5	2,9	3,3	3,7	88,9	1,2
<1,8	184,0	<1,9	195,5	1,0	2,0	<0,7	73,1	<0,8	1,3	2,7	<0,9	94,1	<1,0
-	153,0	-	156,0	0,4	1,1	-	77,0	-	0,5	1,4	-	98,0	-
0,1	100,0	-	102,1	2,4	0,6	0,2	144,7	-	1,6	0,4	0,1	98,0	-
-	114,3	-	120,1	4,9	1,0	-	118,3	-	4,0	0,7	-	95,3	-
4,4	84,0	5,5	99,9	entfällt									
0,9	124,0	-	127,8	2,0	0,7	0,9	113,6	-	1,6	0,6	0,7	97,0	-
-	148,0	-	151,0	1,2	0,6	-	78,8	-	1,3	0,7	-	98,0	-
-	151,0	-	153,6	1,1	0,3	-	81,2	-	1,3	0,4	-	98,3	-
2,5	114,0	-	122,3	1,5	3,6	2,1	98,7	-	1,4	3,3	2,0	93,2	-
3,9	157,0	-	171,5	1,1	3,0	1,5	61,8	-	1,7	4,4	2,3	91,5	-
5,8	120,0	-	132,6	1,6	2,3	3,3	68,1	-	2,1	3,0	4,4	90,5	-
4,4	127,0	1,1	139,0	1,1	2,4	2,4	69,0	0,6	1,5	3,2	3,2	91,3	0,8
6,8	108,0	-	119,6	1,3	2,9	6,0	95,4	-	1,2	2,7	5,7	90,0	-
11,3	175,0	-	190,0	1,1	0,2	4,1	64,4	-	1,6	0,4	5,9	92,0	-
1,0	155,0	-	163,1	0,8	2,2	0,4	65,2	-	1,2	3,2	0,6	95,0	-
1,1	127,0	0,7	136,3	2,0	3,5	0,9	97,8	0,5	2,1	3,4	0,8	93,3	0,5
-	109,0	0,4	112,0	1,1	0,7	-	76,7	0,3	1,4	0,9	-	97,3	0,4

Tabelle 3: Zur Messung eingesetzte Lipidmenge sowie gemessene und korrigierte Werte der Lipidkomponenten der Petrolätherextrakte in μg und in % von der eingesetzten Menge von *T. utilis*; Meßmethode: Remissionsmessung.
(B = Biotin, A = Aneurin, S = Saccharose, NaAc = Natriumacetat, C = Kohlenstoffquelle, subm. = Submerskultur;
DAG = Diacylglycerine, St = Sterine, Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester).

Analyse Nr.	WÖLTJE-Lösung	Kulturdauer in h	Eingesetzte Menge in μg	Gemessene Lipidkomponenten in μg					
				DAG	St	Fs	TAG	StE	Lipidkon- DAG
27	1/1 N	96	93,7	4,3	6,9	1,4	86,6	6,2	4,6
28	1/1 N	144	93,0	3,2	3,9	0,6	97,6	4,1	3,4
29	1/1 N	288	104,0	2,1	6,1	0,4	86,6	9,1	2,0
30	1/1 N + B	96	92,3	6,1	6,4	1,1	92,5	4,8	6,6
31	1/1 N + B	144	89,2	5,1	5,1	Spur	81,5	6,0	5,7
32	1/1 N + B + A	96	78,7	9,0	7,1	1,4	81,0	6,2	11,4
33	1/1 N + B + A	144	71,6	4,2	4,4	Spur	70,5	4,2	5,9
34	1/4 N	96	110,0	2,9	2,3	0,4	86,0	14,7	2,6
35	1/1 N ; 1/2 N 6,5 % S + 1 % NaAc	96 ; 12	75,8	13,1	5,6	1,3	75,0	4,8	17,3
36	"	96 ; 24	91,0	15,6	6,2	0,2	84,9	5,2	17,1
37	"	96 ; 36	73,6	14,1	4,4	Spur	71,0	4,8	19,2
38	1/1 N ; 1/2 N 0 % S + 1 % NaAc	96 ; 12	62,6	14,8	5,5	Spur	58,0	3,9	23,7
39	"	96 ; 24	81,6	11,25	10,9	1,15	100,0	6,6	13,8
40	"	96 ; 36	80,8	8,9	8,9	1,25	63,9	5,2	11,0
41	1/2 N subm.	48	78,3	0,6	3,3	18,7	51,3	3,1	0,8
42	1/8 N + B subm.	48	67,9	6,4	4,6	2,9	48,6	2,8	9,4

Werte					Korrigierte Werte									
Anteile in % v. d. einges. Menge				Summe der %	Lipidkomponenten in μg					Lipidkomponenten in % v. Petrolätherextr.				
Fs	TAG	StE			DAG	St	Fs	TAG	StE	DAG	St	Fs	TAG	StE
4	1,5	91,8	6,6	111,9	3,8	6,1	1,2	76,4	5,5	4,1	6,5	1,3	81,5	5,9
2	0,6	105,0	4,4	117,6	2,7	3,3	0,5	83,0	3,5	2,9	3,5	0,5	89,2	3,8
8	0,4	82,5	8,7	99,4	entfällt									
9	1,2	100,2	5,2	120,1	5,1	5,3	0,9	77,2	4,0	5,5	5,7	1,0	83,6	4,3
7	Spur	91,5	6,7	109,6	4,6	4,6	Spur	74,4	5,5	5,1	5,1	Spur	83,4	6,2
0	1,8	102,9	5,0	133,0	6,8	5,3	1,0	60,9	4,7	8,6	6,7	1,3	77,4	6,0
1	Spur	98,5	5,9	116,4	3,6	3,8	Spur	60,6	3,6	5,0	5,3	Spur	84,6	5,0
1	0,3	78,2	13,4	96,6	entfällt									
4	1,7	98,9	6,3	131,6	10,0	4,2	1,0	57,0	3,6	13,2	5,5	1,3	75,2	4,7
8	0,2	93,4	5,7	123,2	12,7	5,0	0,2	68,9	4,2	13,9	5,5	0,2	75,7	4,6
0	Spur	96,5	6,5	128,2	11,0	3,4	Spur	55,4	3,7	14,9	4,6	Spur	75,3	5,0
3	Spur	92,6	6,2	131,8	11,2	4,4	Spur	44,0	2,9	17,9	7,0	Spur	70,3	4,6
4	1,4	122,5	8,1	159,2	7,1	6,8	0,7	62,6	4,1	8,7	8,3	0,9	76,7	5,0
0	1,5	79,0	6,4	108,9	8,2	8,2	1,1	58,7	4,8	10,1	10,1	1,4	72,6	5,9
2	23,9	65,5	4,0	98,4	entfällt									
8	4,3	71,6	4,1	96,2	entfällt									

TABELLENANHANG II

Die folgenden Tabellen geben die relativen Retentionsvolumina der Fettsäuremethylester (V_{rel} d. FsME ; die Unterschiede in einigen Tabellen ergeben sich aus geringen Temperaturdifferenzen und der Benutzung zweier Säulen, die zwar gleich beschichtet waren, aber durch unterschiedliche Belastung im Kompensationsbetrieb leichte Differenzen zeigten), bezogen auf Palmitinsäuremethylester und die prozentuale Zusammensetzung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten wieder. Die Werte wurden durch quantitative Auswertung der Gaschromatogramme nach der Methode Peak-Höhe x Gesamtretentionszeit (R. KAISER, 1965) und unter Verwendung der 100% -Methode erhalten.

Tabelle 1: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 96 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V_{rel} d. FsME	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,27	0,2	1,2	0,7	0,1	1,3
C ₁₂₌₁	0,38	-	0,2	0,1	-	0,2
C ₁₄₌₀	0,51	1,1	3,9	1,6	0,8	6,5
C ₁₄₌₁	0,62	-	-	-	-	1,0
C ₁₅₌₀	0,73	0,4	1,2	0,5	0,3	2,2
C ₁₅₌₁	0,85	0,1	0,3	0,1	-	1,3
C ₁₆₌₀	1,00	20,3	28,2	20,2	22,8	22,6
C ₁₆₌₁	1,17	< 0,1	0,7	0,7	0,1	8,6
C ₁₇₌₀	1,46	0,5	0,7	0,6	1,2	0,9
C ₁₇₌₁	1,66	0,3	0,4	0,4	0,6	0,6
C ₁₈₌₀	2,02	6,0	9,1	4,2	5,0	7,9
C ₁₈₌₁	2,28	43,4	39,2	36,3	53,3	14,2
C ₁₈₌₂	2,95	24,9	14,1	30,4	13,7	31,9
C ₁₈₌₃	3,99	2,9	0,6	4,2	1,3	1,6

Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von E. vernalis; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 144 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (MAG = Monoacylglycerine, DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} FsMF	DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,27	0,5	1,5	<0,1	1,6
C ₁₂₌₁	0,38	-	-	-	-
C ₁₄₌₀	0,51	9,8	3,2	0,4	2,9
C ₁₄₌₁	0,62	-	-	-	0,5
C ₁₅₌₀	0,73	0,3	1,3	0,2	0,6
C ₁₅₌₁	0,85	<0,1	0,6	-	0,7
C ₁₆₌₀	1,00	18,3	23,7	19,1	18,1
C ₁₆₌₁	1,17	0,2	1,9	0,1	2,4
C ₁₇₌₀	1,46	0,9	2,1	0,8	4,6
C ₁₇₌₁	1,66	0,5	0,9	0,5	0,8
C ₁₈₌₀	2,02	3,1	18,1	3,7	3,5
C ₁₈₌₁	2,28	50,1	34,3	58,5	28,0
C ₁₈₌₂	2,95	23,0	10,9	15,7	32,9
C ₁₈₌₃	3,99	2,1	1,5	1,0	3,3

Tabelle 3: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von E. vernalis; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 288 h.

Fettsäuren	MAG	DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	2,1	0,1	1,4	0,1	1,0
C ₁₂₌₁	-	<0,1	-	-	<0,1
C ₁₄₌₀	5,3	0,4	2,9	0,45	2,7
C ₁₄₌₁	-	<0,1	-	-	0,8
C ₁₅₌₀	1,9	0,4	1,2	0,4	1,0
C ₁₅₌₁	0,9	0,1	0,1	-	0,4
C ₁₆₌₀	25,6	11,6	24,3	14,3	11,9
C ₁₆₌₁	2,9	0,6	1,2	0,1	3,6
C ₁₇₌₀	3,6	1,3	2,2	1,7	1,7
C ₁₇₌₁	1,5	0,6	0,6	0,8	0,5
C ₁₈₌₀	7,7	3,8	12,9	4,2	5,4
C ₁₈₌₁	33,1	48,1	32,2	53,1	12,4
C ₁₈₌₂	15,3	30,7	19,3	23,3	55,8
C ₁₈₌₃	-	2,2	1,3	1,6	2,8

Tabelle 4: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N -WÖLTJE-Lsg. mit 13 µg Biotin/Ltr.; Ernte nach 96 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (MAG = Monoacylglycerine, DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, SE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE	MAG
C ₁₂₌₀	0,27	0,2	0,2	0,4	<0,1	0,6	-
C ₁₂₌₁	0,38	0,1	0,1	<0,1	-	0,2	0,9
C ₁₄₌₀	0,51	1,0	1,1	0,9	0,4	1,9	3,8
C ₁₄₌₁	0,62	-	-	<0,1	-	0,2	-
C ₁₅₌₀	0,73	0,4	0,5	0,4	0,2	0,5	0,5
C ₁₅₌₁	0,85	-	-	<0,1	-	0,2	-
C ₁₆₌₀	1,00	14,8	15,7	14,4	16,0	21,3	17,1
C ₁₆₌₁	1,17	0,6	0,4	0,2	0,1	2,1	3,8
C ₁₇₌₀	1,46	0,9	1,0	1,0	1,1	0,6	1,8
C ₁₇₌₁	1,66	0,3	0,4	0,3	0,2	0,4	0,8
C ₁₈₌₀	2,02	6,0	8,8	10,9	13,1	4,6	6,2
C ₁₈₌₁	2,28	41,1	42,8	42,8	48,9	31,3	44,8
C ₁₈₌₂	2,95	31,2	26,9	26,8	18,4	33,3	20,1
C ₁₈₌₃	3,99	3,3	1,8	1,8	1,5	2,4	-

Tabelle 5: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N -WÖLTJE-Lsg. mit 13 µg Biotin/Ltr.; Ernte nach 144 h.

Fettsäuren	DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,9	0,2	<0,1	1,2
C ₁₂₌₁	-	<0,1	-	<0,1
C ₁₄₌₀	0,9	0,4	0,2	1,4
C ₁₄₌₁	-	-	-	0,2
C ₁₅₌₀	0,5	0,3	0,2	0,5
C ₁₅₌₁	0,9	-	-	0,2
C ₁₆₌₀	15,9	14,5	12,9	11,6
C ₁₆₌₁	<0,1	<0,1	<0,1	1,3
C ₁₇₌₀	0,9	1,2	1,3	0,7
C ₁₇₌₁	0,6	0,2	0,3	0,4
C ₁₈₌₀	12,6	2,4	10,1	6,0
C ₁₈₌₁	43,7	53,2	50,0	24,7
C ₁₈₌₂	22,1	26,0	23,2	49,6
C ₁₈₌₃	1,0	2,1	1,5	2,6

Tabelle 6: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. mit 13 µg Biotin + 50 µg Aneurin/Ltr.; Ernte nach 96 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (MAG = Monoacylglycerine, DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, SE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	SE	MAG	Fettsäuren	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	SE
C ₁₂₌₀	0,27	0,1	0,1	0,4	< 0,1	4,8	1,1	C ₁₂₌₀	0,1	0,5	3,2	< 0,1	1,6
C ₁₂₌₁	0,38	-	-	-	-	0,2	-	C ₁₂₌₁	0,2	0,8	3,7	< 0,1	2,4
C ₁₄₌₀	0,51	0,7	0,9	1,0	0,3	3,3	5,9	C ₁₄₌₀	2,2	7,3	28,5	< 0,1	27,2
C ₁₄₌₁	0,62	-	-	-	-	-	-	C ₁₄₌₁	< 0,1	-	0,8	< 0,1	-
C ₁₅₌₀	0,73	0,4	0,5	0,5	0,2	1,0	0,8	C ₁₅₌₀	0,1	0,6	2,5	< 0,1	1,9
C ₁₅₌₁	0,85	-	-	-	-	0,3	-	C ₁₅₌₁	0,7	1,9	5,4	< 0,1	9,0
C ₁₆₌₀	1,00	15,1	17,4	18,1	13,4	15,2	24,4	C ₁₆₌₀	19,8	9,2	14,9	11,0	6,9
C ₁₆₌₁	1,17	0,3	0,2	0,5	0,1	3,7	3,5	C ₁₆₌₁	< 0,1	< 0,1	2,8	-	1,6
C ₁₇₌₀	1,46	1,0	1,4	1,6	1,3	0,9	2,3	C ₁₇₌₀	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-
C ₁₇₌₁	1,66	0,4	0,6	0,5	0,4	0,7	1,2	C ₁₇₌₁	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-
C ₁₈₌₀	2,02	4,8	7,7	10,5	10,2	3,9	7,4	C ₁₈₌₀	0,9	0,5	4,4	1,0	2,1
C ₁₈₌₁	2,28	35,3	38,8	35,3	47,5	15,3	30,9	C ₁₈₌₁	47,2	58,3	16,2	68,5	8,9
C ₁₈₌₂	2,95	35,0	28,7	27,8	22,7	44,4	18,1	C ₁₈₌₂	28,4	20,6	17,4	19,2	37,1
C ₁₈₌₃	3,99	6,6	3,7	3,6	3,8	6,4	4,2	C ₁₈₌₃	0,1	0,2	< 0,1	0,2	9,0

Tabelle 7: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 96 h.

Tabelle 8: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 12 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (MAG = Monoacylglycerine, DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V rel der FsME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	StE	Fettsäuren	MAG	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,27	0,1	-	0,6	< 0,1	0,9	C ₁₂₌₀	0,1	0,2	0,5	0,2	< 0,1	1,0
C ₁₂₌₁	0,38	0,1	-	0,1	< 0,1	0,2	C ₁₂₌₁	< 0,1	< 0,1	0,1	0,1	< 0,1	0,6
C ₁₄₌₀	0,51	1,1	2,8	7,5	0,1	12,6	C ₁₄₌₀	3,3	4,2	8,0	0,7	< 0,1	20,8
C ₁₄₌₁	0,62	-	-	0,1	< 0,1	0,4	C ₁₄₌₁	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-
C ₁₅₌₀	0,73	< 0,1	-	0,3	< 0,1	1,5	C ₁₅₌₀	< 0,1	< 0,1	0,5	0,1	< 0,1	0,2
C ₁₅₌₁	0,85	-	-	0,2	< 0,1	0,9	C ₁₅₌₁	< 0,1	< 0,1	0,2	0,1	< 0,1	0,5
C ₁₆₌₀	1,00	13,5	15,1	19,2	21,1	16,2	C ₁₆₌₀	15,8	13,2	23,2	13,4	20,3	10,2
C ₁₆₌₁	1,17	< 0,1	-	0,2	< 0,1	3,0	C ₁₆₌₁	< 0,1	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	4,7
C ₁₇₌₀	1,46	-	-	0,3	0,3	0,6	C ₁₇₌₀	< 0,1	< 0,1	1,4	0,1	< 0,1	4,9
C ₁₇₌₁	1,66	-	-	0,3	0,1	-	C ₁₇₌₁	0,1	0,2	0,3	0,2	< 0,1	1,3
C ₁₈₌₀	2,02	2,3	2,6	4,4	3,0	4,2	C ₁₈₌₀	1,9	1,3	2,0	3,4	1,3	2,6
C ₁₈₌₁	2,28	53,5	57,2	41,1	60,4	25,2	C ₁₈₌₁	61,3	53,8	51,7	37,3	62,9	14,5
C ₁₈₌₂	2,95	28,2	15,0	24,0	14,5	33,4	C ₁₈₌₂	16,9	26,2	11,7	43,4	15,0	36,7
C ₁₈₌₃	3,99	1,1	7,1	1,5	2,8	1,4	C ₁₈₌₃	0,3	0,8	0,3	0,9	0,2	2,0

Tabelle 9: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 24 h.

Tabelle 10: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 35 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,27	<0,1	0,5	0,2	<0,1	1,2
C ₁₂₌₁	0,38	<0,1	0,3	<0,1	<0,1	0,6
C ₁₄₌₀	0,51	1,9	7,0	4,0	<0,1	14,5
C ₁₄₌₁	0,62	-	-	-	<0,1	-
C ₁₅₌₀	0,73	<0,1	0,4	0,1	<0,1	0,8
C ₁₅₌₁	0,85	<0,1	0,6	<0,1	<0,1	1,3
C ₁₆₌₀	1,00	15,5	15,2	13,8	19,6	17,4
C ₁₆₌₁	1,17	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	1,0
C ₁₇₌₀	1,46	0,5	2,0	0,6	0,2	1,8
C ₁₇₌₁	1,66	0,1	0,4	0,7	<0,1	0,3
C ₁₈₌₀	2,02	0,5	1,4	2,4	2,4	3,4
C ₁₈₌₁	2,28	53,1	54,0	35,9	57,2	16,2
C ₁₈₌₂	2,95	27,7	12,5	40,9	19,6	40,2
C ₁₈₌₃	3,99	0,3	5,5	1,0	0,7	1,1

Tabelle 11: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 6 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	0,1	0,4	1,3	<0,1	1,5
C ₁₂₌₁	0,42	<0,1	<0,1	<0,1	-	-
C ₁₄₌₀	0,55	0,5	1,0	4,0	0,2	5,3
C ₁₄₌₁	0,64	<0,1	<0,1	<0,1	-	-
C ₁₅₌₀	0,76	0,2	0,2	1,7	<0,1	1,4
C ₁₅₌₁	0,89	<0,1	0,1	0,6	-	0,7
C ₁₆₌₀	1,00	15,7	23,2	20,4	20,2	20,9
C ₁₆₌₁	1,19	<0,1	<0,1	1,7	<0,1	2,7
C ₁₇₌₀	1,42	0,3	0,5	0,6	0,5	0,7
C ₁₇₌₁	1,65	0,2	0,5	0,5	0,4	0,5
C ₁₈₌₀	1,99	2,5	5,6	6,6	5,5	8,5
C ₁₈₌₁	2,23	48,8	48,2	24,6	44,3	18,2
C ₁₈₌₂	2,86	29,5	19,1	33,1	27,7	36,4
C ₁₈₌₃	3,94	2,0	1,1	2,8	1,1	1,9

Tabelle 12: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 12 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE	Fettsäuren	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	0,2	0,3	1,3	<0,1	3,1	C ₁₂₌₀	0,1	0,4	1,2	<0,1	1,5
C ₁₂₌₁	0,42	<0,1	0,3	0,1	<0,1	0,1	C ₁₂₌₁	<0,1	<0,1	0,1	-	0,2
C ₁₄₌₀	0,55	2,8	5,5	8,2	0,2	9,8	C ₁₄₌₀	1,4	3,5	6,9	0,1	11,8
C ₁₄₌₁	0,64	0,1	0,6	0,8	-	1,6	C ₁₄₌₁	0,1	0,5	1,4	0,2	2,8
C ₁₅₌₀	0,76	0,2	0,3	1,0	<0,1	0,8	C ₁₅₌₀	0,2	0,3	0,9	-	1,3
C ₁₅₌₁	0,89	-	0,1	0,5	-	0,6	C ₁₅₌₁	<0,1	0,1	0,3	0,1	0,9
C ₁₆₌₀	1,00	12,3	17,3	18,7	13,7	18,5	C ₁₆₌₀	12,2	17,0	19,9	18,9	18,1
C ₁₆₌₁	1,19	<0,1	<0,1	3,3	<0,1	2,9	C ₁₆₌₁	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	5,3
C ₁₇₌₀	1,42	0,2	0,5	0,4	0,4	0,8	C ₁₇₌₀	0,2	0,4	0,5	0,4	0,6
C ₁₇₌₁	1,65	0,2	0,3	0,6	0,2	0,6	C ₁₇₌₁	0,2	0,3	0,3	0,2	0,6
C ₁₈₌₀	1,99	1,3	3,7	5,1	2,2	4,7	C ₁₈₌₀	1,9	3,5	5,6	2,8	5,8
C ₁₈₌₁	2,23	44,7	48,6	31,1	58,3	35,6	C ₁₈₌₁	43,6	46,9	33,1	52,4	18,6
C ₁₈₌₂	2,86	34,0	21,9	24,6	23,5	19,1	C ₁₈₌₂	36,8	25,3	27,7	21,6	28,2
C ₁₈₌₃	3,94	4,0	0,6	4,2	1,5	1,4	C ₁₈₌₃	3,5	1,7	1,9	3,2	3,6

Tabelle 13: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 24 h.

Tabelle 14: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 6 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidsäureester. (TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	StE	Fettsäuren	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	0,2	0,2	1,0	<0,1	1,5	C ₁₂₌₀	<0,1	<0,1	1,3	<0,1	1,2
C ₁₂₌₁	0,42	-	<0,1	<0,1	-	-	C ₁₂₌₁	<0,1	0,3	0,2	-	0,3
C ₁₄₌₀	0,55	0,7	1,1	1,5	0,2	5,5	C ₁₄₌₀	0,5	1,3	2,9	0,3	8,1
C ₁₄₌₁	0,64	-	<0,1	<0,1	-	0,6	C ₁₄₌₁	-	0,2	<0,1	-	0,6
C ₁₅₌₀	0,76	0,4	0,4	0,5	<0,1	1,4	C ₁₅₌₀	0,2	0,3	0,8	0,1	3,0
C ₁₅₌₁	0,89	-	<0,1	<0,1	-	0,5	C ₁₅₌₁	-	0,2	0,2	-	0,8
C ₁₆₌₀	1,00	16,8	21,7	18,2	16,2	21,4	C ₁₆₌₀	14,6	19,2	19,0	19,0	31,1
C ₁₆₌₁	1,19	<0,1	2,2	8,4	0,1	6,0	C ₁₆₌₁	0,3	0,7	0,9	<0,1	7,0
C ₁₇₌₀	1,42	0,6	0,8	0,3	0,5	0,8	C ₁₇₌₀	0,4	0,9	1,2	0,5	1,6
C ₁₇₌₁	1,65	0,2	0,6	1,1	0,2	0,9	C ₁₇₌₁	0,2	0,5	0,4	0,2	0,9
C ₁₈₌₀	1,99	2,9	4,1	3,1	4,8	7,9	C ₁₈₌₀	3,2	6,9	8,0	5,6	12,3
C ₁₈₌₁	2,23	45,7	50,3	38,5	56,4	26,7	C ₁₈₌₁	48,2	51,7	32,4	54,6	15,9
C ₁₈₌₂	2,86	31,0	17,4	24,0	20,4	24,2	C ₁₈₌₂	31,6	17,6	30,5	18,9	15,9
C ₁₈₌₃	3,94	1,4	0,9	3,0	1,1	2,2	C ₁₈₌₃	0,6	-	1,8	0,7	0,8

Tabelle 15: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 12 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidsäureester. (DAG = Diacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Tabelle 16: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 24 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester, MAG = Monoacylglycerine.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE	Fettsäuren	MAG	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	<0,1	<0,1	0,9	-	1,6	C ₁₂₌₀	2,5	0,2	0,3	<0,1	-	1,1
C ₁₂₌₁	0,42	<0,1	<0,1	-	-	0,8	C ₁₂₌₁	1,8	0,3	0,1	<0,1	-	0,5
C ₁₄₌₀	0,55	0,5	0,9	2,2	0,2	5,7	C ₁₄₌₀	74,9	10,0	9,9	1,1	0,1	22,8
C ₁₄₌₁	0,64	<0,1	<0,1	<0,1	-	0,5	C ₁₄₌₁	-	-	-	-	-	-
C ₁₅₌₀	0,76	0,2	0,2	0,7	<0,1	0,9	C ₁₅₌₀	3,1	0,2	<0,1	<0,1	-	0,8
C ₁₅₌₁	0,89	<0,1	<0,1	<0,1	-	0,6	C ₁₅₌₁	-	0,4	-	<0,1	-	0,9
C ₁₆₌₀	1,00	15,6	17,3	20,0	19,4	14,8	C ₁₆₌₀	7,7	10,6	11,3	7,1	12,4	19,0
C ₁₆₌₁	1,19	0,1	0,1	1,2	<0,1	5,5	C ₁₆₌₁	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	4,2
C ₁₇₌₀	1,42	0,5	0,7	0,8	0,4	1,7	C ₁₇₌₀	1,1	-	-	0,2	1,0	-
C ₁₇₌₁	1,65	0,3	0,3	0,3	0,2	0,9	C ₁₇₌₁	-	0,2	-	0,3	0,2	-
C ₁₈₌₀	1,99	1,9	2,5	5,9	3,0	4,5	C ₁₈₌₀	2,0	1,7	2,8	3,3	5,1	4,7
C ₁₈₌₁	2,23	43,5	51,2	33,6	53,5	19,2	C ₁₈₌₁	4,4	40,7	49,7	44,5	58,9	10,8
C ₁₈₌₂	2,86	34,0	24,0	30,7	21,6	35,7	C ₁₈₌₂	2,4	34,6	25,1	42,0	15,0	33,2
C ₁₈₌₃	3,94	2,8	1,6	2,9	1,6	3,0	C ₁₈₌₃	-	0,9	0,7	1,2	7,1	1,9

Tabelle 17: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. mit 6,5 % Saccharose und 1 % Natriumacetat als Kohlenstoffquelle; Ernte nach 12 h.

Tabelle 18: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von E. vernalis; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. mit 6,5 % Saccharose und 1 % Natriumacetat als Kohlenstoffquelle; Ernte nach 24 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine,

Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE	Fettsäuren	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,33	0,1	0,2	<0,1	<0,1	0,5	C ₁₂₌₀	0,1	0,1	<0,1	<0,1	0,4
C ₁₂₌₁	0,39	<0,1	-	-	-	-	C ₁₂₌₁	<0,1	<0,1	-	<0,1	0,1
C ₁₄₌₀	0,50	2,9	6,3	0,5	<0,1	18,0	C ₁₄₌₀	1,6	5,0	0,3	<0,1	11,1
C ₁₄₌₁	0,63	-	-	-	-	-	C ₁₄₌₁	-	-	-	<0,1	<0,1
C ₁₅₌₀	0,74	<0,1	<0,1	<0,1	-	-	C ₁₅₌₀	0,1	0,2	<0,1	<0,1	1,4
C ₁₅₌₁	0,82	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	-	C ₁₅₌₁	0,1	0,3	<0,1	<0,1	0,8
C ₁₆₌₀	1,00	12,4	12,0	5,5	16,1	10,0	C ₁₆₌₀	6,3	10,1	3,1	16,2	12,7
C ₁₆₌₁	1,15	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	1,2	C ₁₆₌₁	<0,1	<0,1	<0,1	-	1,7
C ₁₇₌₀	1,32	0,3	-	0,2	0,8	-	C ₁₇₌₀	0,2	-	-	0,1	2,7
C ₁₇₌₁	1,59	0,1	-	-	<0,1	-	C ₁₇₌₁	<0,1	0,1	-	<0,1	0,2
C ₁₈₌₀	1,92	2,5	4,3	1,8	6,9	6,2	C ₁₈₌₀	2,0	2,0	0,7	8,5	5,6
C ₁₈₌₁	2,18	55,1	45,8	46,6	60,3	13,5	C ₁₈₌₁	51,2	56,0	47,8	58,0	31,5
C ₁₈₌₂	2,79	25,8	31,0	43,4	15,3	49,6	C ₁₈₌₂	36,8	26,0	46,8	16,0	31,2
C ₁₈₌₃	3,82	0,6	0,2	1,7	0,2	0,9	C ₁₈₌₃	1,3	0,3	1,2	0,6	0,5

Tabelle 20: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen

Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. mit 0 % Saccharose und 1 % Natriumacetat als Kohlenstoffquelle; Ernte nach 12 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,33	0,2	<0,1	0,3	-	0,5
C ₁₂₌₁	0,39	<0,1	<0,1	<0,1	-	0,1
C ₁₄₌₀	0,50	3,6	7,8	6,2	0,3	8,9
C ₁₄₌₁	0,63	-	<0,1	-	-	<0,1
C ₁₅₌₀	0,74	0,3	0,2	0,2	0,6	0,2
C ₁₅₌₁	0,82	0,3	0,5	0,4	0,2	0,4
C ₁₆₌₀	1,00	10,6	9,6	6,2	15,4	8,0
C ₁₆₌₁	1,15	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	2,0
C ₁₇₌₀	1,32	0,6	1,3	0,5	2,4	-
C ₁₇₌₁	1,59	0,5	0,2	0,2	0,4	-
C ₁₈₌₀	1,92	2,8	2,6	2,0	5,8	3,1
C ₁₈₌₁	2,18	45,9	47,0	40,8	56,1	13,9
C ₁₈₌₂	2,79	33,5	30,0	45,9	21,0	59,3
C ₁₈₌₃	3,82	1,5	1,0	4,1	1,2	2,5

Tabelle 21: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen

Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. mit 0 % Saccharose und 1 % Natriumacetat als Kohlenstoffquelle; Ernte nach 24 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,1	0,3	0,3	-	1,1
C ₁₂₌₁	<0,1	0,1	<0,1	-	0,2
C ₁₄₌₀	3,5	9,9	2,7	0,6	16,8
C ₁₄₌₁	-	-	0,4	-	-
C ₁₅₌₀	0,8	2,4	0,4	0,6	0,3
C ₁₅₌₁	0,4	1,8	<0,1	0,1	2,7
C ₁₆₌₀	11,1	11,3	6,7	16,5	6,6
C ₁₆₌₁	<0,1	0,2	<0,1	<0,1	3,2
C ₁₇₌₀	0,6	-	0,3	1,8	3,7
C ₁₇₌₁	0,6	0,4	0,5	1,1	0,8
C ₁₈₌₀	3,9	3,7	1,7	8,2	2,5
C ₁₈₌₁	56,5	44,7	46,8	58,1	14,0
C ₁₈₌₂	21,3	22,7	40,9	16,2	40,7
C ₁₈₌₃	0,6	1,6	3,4	0,6	0,9

Tabelle 22: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. mit 0 % Saccharose und 1 % Natriumacetat als Kohlenstoffquelle; Ernte nach 36 h.

Die Analysewerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (TAG = Triacylglycerine, SFE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	SfE
C ₁₂₌₀	0,33	4,0	0,4	0,2	<0,1	1,3
C ₁₂₌₁	0,39	0,5	0,3	<0,1	-	0,3
C ₁₄₌₀	0,51	8,8	4,4	0,3	<0,1	21,6
C ₁₄₌₁	0,63	-	-	-	-	0,5
C ₁₅₌₀	0,74	0,2	0,1	<0,1	-	0,4
C ₁₅₌₁	0,82	2,3	0,2	0,1	-	5,1
C ₁₆₌₀	1,00	9,5	10,8	5,7	17,3	10,5
C ₁₆₌₁	1,15	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	3,0
C ₁₇₌₀	1,32	0,6	-	<0,1	-	1,1
C ₁₇₌₁	1,59	0,5	0,3	<0,1	<0,1	1,4
C ₁₈₌₀	1,92	1,7	2,4	0,6	7,0	2,9
C ₁₈₌₁	2,18	34,5	55,9	40,4	66,4	12,3
C ₁₈₌₂	2,79	35,0	24,5	46,1	8,8	32,3
C ₁₈₌₃	3,82	2,3	0,6	6,2	<0,1	1,9

Tabelle 23: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. ohne Kohlenstoffquelle; Ernte nach 12 h.

Die Analysewerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, SFE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	SfE
C ₁₂₌₀	0,32	0,2	0,3	0,4	<0,1	4,4
C ₁₂₌₁	0,42	0,1	-	<0,1	<0,1	0,3
C ₁₄₌₀	0,55	6,2	5,9	10,7	<0,1	14,5
C ₁₄₌₁	0,64	-	-	0,5	<0,1	1,5
C ₁₅₌₀	0,76	0,2	-	3,3	<0,1	0,4
C ₁₅₌₁	0,89	2,5	2,1	3,3	<0,1	4,6
C ₁₆₌₀	1,00	8,1	9,9	14,3	16,0	18,4
C ₁₆₌₁	1,19	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	7,4
C ₁₇₌₀	1,42	-	-	-	0,1	0,8
C ₁₇₌₁	1,65	0,5	-	-	<0,1	0,2
C ₁₈₌₀	1,99	2,4	2,3	5,4	2,1	2,8
C ₁₈₌₁	2,23	55,1	60,0	22,2	65,4	15,4
C ₁₈₌₂	2,86	22,9	18,5	39,0	15,5	27,0
C ₁₈₌₃	3,94	0,6	<0,1	<0,1	0,7	0,7

Tabelle 24: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg. ohne Kohlenstoffquelle; Ernte nach 24 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE		Fettsäuren	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	9,7	2,6	3,9	<0,1	3,8		C ₁₂₌₀	2,0	0,6	1,1	0,1	1,2
C ₁₂₌₁	0,42	0,8	0,5	1,5	<0,1	2,1		C ₁₂₌₁	0,4	0,7	1,4	<0,1	1,2
C ₁₄₌₀	0,55	19,6	9,2	18,6	<0,1	25,8		C ₁₄₌₀	10,6	10,3	15,3	0,1	11,9
C ₁₄₌₁	0,64	-	0,2	0,3	<0,1	0,7		C ₁₄₌₁	-	-	-	-	0,5
C ₁₅₌₀	0,76	12,9	5,2	7,7	<0,1	0,8		C ₁₅₌₀	0,1	2,7	0,3	<0,1	0,4
C ₁₅₌₁	0,89	2,0	0,9	3,3	<0,1	11,7		C ₁₅₌₁	3,0	2,0	6,1	-	11,0
C ₁₆₌₀	1,00	11,4	15,6	9,0	15,1	8,7		C ₁₆₌₀	7,4	9,5	9,9	15,8	10,0
C ₁₆₌₁	1,19	1,0	1,2	3,0	0,1	8,5		C ₁₆₌₁	0,3	0,4	2,1	<0,1	7,1
C ₁₇₌₀	1,42	3,6	1,2	1,2	0,2	2,8		C ₁₇₌₀	1,6	0,6	0,6	0,2	0,8
C ₁₇₌₁	1,65	-	-	0,2	<0,1	-		C ₁₇₌₁	0,3	3,8	-	0,2	-
C ₁₈₌₀	1,99	3,1	1,6	1,5	2,2	<1,0		C ₁₈₌₀	3,2	1,3	3,7	2,1	3,2
C ₁₈₌₁	2,23	25,6	47,9	32,8	61,4	8,8		C ₁₈₌₁	50,5	39,6	21,9	56,6	13,4
C ₁₈₌₂	2,86	9,6	13,1	16,5	20,3	25,8		C ₁₈₌₂	18,8	26,3	34,7	24,3	32,3
C ₁₈₌₃	3,94	0,6	0,8	0,4	0,5	0,8		C ₁₈₌₃	0,5	0,4	0,7	0,6	1,1

Tabelle 26: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *E. vernalis*; Kulturbedingungen: Schüttelkultur in 1/8 N-WÖLTJE-Lsg. mit 13 g Biotin/Ltr., nach 18 h Submerskultur in 1/8 N-WÖLTJE-Lsg. mit 13 μ g Biotin/Ltr.; Ernte nach 48 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} d. FsME	DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	0,3	0,6	< 0,1	1,9
C ₁₂₌₁	0,42	0,5	0,7	< 0,1	2,7
C ₁₄₌₀	0,55	19,7	14,8	< 0,1	16,8
C ₁₄₌₁	0,64	< 0,1	0,6	< 0,1	1,7
C ₁₅₌₀	0,76	0,9	< 0,1	< 0,1	-
C ₁₅₌₁	0,89	-	0,3	< 0,1	15,2
C ₁₆₌₀	1,00	14,6	21,6	17,6	10,4
C ₁₆₌₁	1,19	0,1	1,1	< 0,1	11,3
C ₁₇₌₀	1,42	< 0,1	-	-	-
C ₁₇₌₁	1,65	< 0,1	-	-	-
C ₁₈₌₀	1,99	0,8	2,2	2,5	2,4
C ₁₈₌₁	2,23	45,0	24,7	58,7	9,8
C ₁₈₌₂	2,86	34,0	41,5	19,3	24,2
C ₁₈₌₃	3,94	1,4	0,2	1,6	< 0,1

Tabelle 27: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *T. utilis*; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 96 h.

Fettsäuren	V _{rel} d. FsME	DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	< 0,1	0,7	< 0,1	0,1
C ₁₂₌₁	0,42	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1
C ₁₄₌₀	0,52	< 0,1	0,4	< 0,1	0,4
C ₁₄₌₁	0,55	0,1	1,1	< 0,1	< 0,1
C ₁₅₌₀	0,64	0,1	0,2	< 0,1	0,6
C ₁₅₌₁	0,76	< 0,1	0,3	< 0,1	< 0,1
C ₁₆₌₀	0,89	< 0,1	0,3	< 0,1	0,1
C ₁₆₌₁	1,00	12,1	14,5	8,8	0,4
C ₁₇₌₀	1,19	2,3	4,8	2,0	0,3
C ₁₇₌₁	1,42	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1
C ₁₈₌₀	1,65	< 0,1	0,2	< 0,1	< 0,1
C ₁₈₌₁	1,99	0,5	2,1	0,4	0,2
C ₁₈₌₂	2,23	51,9	30,2	63,9	86,0
C ₁₈₌₃	2,86	28,1	30,4	21,6	10,7
C ₁₈₌₃	3,94	4,8	14,4	3,1	0,6

Tabelle 28: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *T. utilis*; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 144 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} d. FsME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	0,1	0,1	1,5	0,1	0,3
C ₁₂₌₁	0,42	< 0,1	< 0,1	0,2	< 0,1	< 0,1
	0,52	0,3	0,4	< 0,1	< 0,1	0,2
C ₁₄₌₀	0,55	< 0,1	0,3	7,9	< 0,1	0,5
C ₁₄₌₁	0,64	-	-	0,4	< 0,1	0,2
C ₁₅₌₀	0,76	< 0,1	0,1	2,8	< 0,1	0,2
C ₁₅₌₁	0,89	< 0,1	0,2	0,8	< 0,1	0,1
C ₁₆₌₀	1,00	6,7	12,4	30,3	12,0	3,4
C ₁₆₌₁	1,19	2,1	3,5	7,9	3,1	3,3
C ₁₇₌₀	1,42	< 0,1	< 0,1	0,7	< 0,1	< 0,1
C ₁₇₌₁	1,65	0,1	0,2	0,7	0,1	0,2
C ₁₈₌₀	1,99	0,2	0,6	6,7	0,5	0,4
C ₁₈₌₁	2,23	58,4	59,0	28,9	65,1	74,2
C ₁₈₌₂	2,86	30,4	22,1	10,5	18,5	16,2
C ₁₈₌₃	3,94	1,1	0,6	0,4	0,7	0,6

Tabelle 29: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *T. utilis*; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 288 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} d. FsME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	0,2	0,1	0,5	< 0,1	< 0,1
C ₁₂₌₁	0,42	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
	0,52	0,6	0,2	1,2	< 0,1	0,2
C ₁₄₌₀	0,55	< 0,1	0,1	3,7	< 0,1	< 0,1
C ₁₄₌₁	0,64	-	-	0,8	< 0,1	< 0,1
C ₁₅₌₀	0,76	< 0,1	< 0,1	2,7	< 0,1	< 0,1
C ₁₅₌₁	0,89	< 0,1	< 0,1	2,7	< 0,1	< 0,1
C ₁₆₌₀	1,00	5,1	4,3	29,4	7,3	0,2
C ₁₆₌₁	1,19	1,3	1,8	10,0	2,0	0,3
C ₁₇₌₀	1,42	-	-	0,4	< 0,1	< 0,1
C ₁₇₌₁	1,65	< 0,1	< 0,1	0,2	< 0,1	< 0,1
C ₁₈₌₀	1,99	0,1	0,3	4,1	0,8	0,1
C ₁₈₌₁	2,23	51,7	64,0	33,2	60,4	72,4
C ₁₈₌₂	2,86	35,1	26,3	11,0	25,7	24,9
C ₁₈₌₃	3,94	5,3	2,3	1,8	3,7	1,8

Tabelle 30: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *T. utilis*; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. mit 13 µg Biotin/Ltr.; Ernte nach 96 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (TAG = Triacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} d. FsME	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	0,1	0,2	1,2	<0,1	0,1
C ₁₂₌₁	0,42	<0,1	0,1	0,3	<0,1	<0,1
	0,52	0,3	0,7	1,2	<0,1	0,6
C ₁₄₌₀	0,55	0,3	1,2	2,9	<0,1	0,4
C ₁₄₌₁	0,64	<0,1	<0,1	-	<0,1	<0,1
C ₁₅₌₀	0,76	<0,1	<0,1	1,2	<0,1	0,1
C ₁₅₌₁	0,89	<0,1	0,1	0,8	<0,1	<0,1
C ₁₆₌₀	1,00	12,2	12,4	26,3	10,2	2,4
C ₁₆₌₁	1,19	2,4	2,1	8,4	1,9	2,3
C ₁₇₌₀	1,42	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1
C ₁₇₌₁	1,65	<0,1	0,1	0,3	<0,1	0,1
C ₁₈₌₀	1,99	0,2	0,5	1,9	0,9	0,8
C ₁₈₌₁	2,23	54,5	60,3	44,9	66,2	74,3
C ₁₈₌₂	2,86	27,8	21,6	9,1	19,2	18,2
C ₁₈₌₃	3,94	1,8	0,5	0,6	1,4	0,4

Tabelle 31: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *T. utilis*; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. mit 13 µg Biotin/Ltr.; Ernte nach 144 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, DAG = Diacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} d. FsME	1,2-DAG	1,3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	<0,1	<0,1	2,3	<0,1	0,7
C ₁₂₌₁	0,42	<0,1	<0,1	0,2	<0,1	<0,1
	0,52	<0,1	0,2	1,2	<0,1	0,4
C ₁₄₌₀	0,55	<0,1	<0,1	4,4	<0,1	0,2
C ₁₄₌₁	0,64	<0,1	<0,1	-	<0,1	<0,1
C ₁₅₌₀	0,76	<0,1	<0,1	1,7	<0,1	<0,1
C ₁₅₌₁	0,89	<0,1	<0,1	0,6	<0,1	<0,1
C ₁₆₌₀	1,00	11,9	7,4	25,4	9,5	0,9
C ₁₆₌₁	1,19	3,3	1,7	8,3	1,6	1,7
C ₁₇₌₀	1,42	-	-	0,3	<0,1	<0,1
C ₁₇₌₁	1,65	0,1	<0,1	0,4	<0,1	0,1
C ₁₈₌₀	1,99	0,9	1,2	3,7	1,0	0,3
C ₁₈₌₁	2,23	45,0	60,2	30,0	68,4	69,7
C ₁₈₌₂	2,86	32,5	26,0	19,2	18,1	23,6
C ₁₈₌₃	3,94	6,1	2,9	1,9	1,2	2,0

Tabelle 32: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von T. utilis; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. mit 13 µg Biotin + 50 µg Aneurin/Ltr.; Kulturdauer: 96 h.

Fettsäuren	V _{rel} d. FsME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	<0,1	<0,1	0,8	<0,1	<0,1
C ₁₂₌₁	0,42	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	0,52	0,3	0,2	0,7	<0,1	0,2
C ₁₄₌₀	0,55	<0,1	0,1	1,8	<0,1	0,2
C ₁₄₌₁	0,64	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C ₁₅₌₀	0,76	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C ₁₅₌₁	0,89	<0,1	<0,1	0,6	<0,1	<0,1
C ₁₆₌₀	1,00	8,8	14,3	15,9	3,7	1,4
C ₁₆₌₁	1,19	1,9	2,4	4,2	0,8	1,0
C ₁₇₌₀	1,42	<0,1	<0,1	0,2	<0,1	<0,1
C ₁₇₌₁	1,65	<0,1	<0,1	0,3	<0,1	<0,1
C ₁₈₌₀	1,99	0,2	1,4	3,5	0,2	0,7
C ₁₈₌₁	2,23	61,4	64,1	38,3	81,5	80,0
C ₁₈₌₂	2,86	25,1	16,8	25,4	13,2	15,2
C ₁₈₌₃	3,94	1,9	0,4	8,1	0,4	0,8

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Tabelle 33: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von T. utilis; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. mit 13 µg Biotin + 50 µg Aneurin/Ltr.; Kulturdauer: 144 h.

Fettsäuren	V _{rel} d. FsME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	<0,1	0,1	2,1	<0,1	<0,1
C ₁₂₌₁	0,42	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1
	0,52	0,3	0,3	0,7	<0,1	0,1
C ₁₄₌₀	0,55	0,1	0,2	4,9	<0,1	<0,1
C ₁₄₌₁	0,64	-	-	-	-	<0,1
C ₁₅₌₀	0,76	<0,1	<0,1	1,9	<0,1	<0,1
C ₁₅₌₁	0,89	<0,1	<0,1	0,4	<0,1	<0,1
C ₁₆₌₀	1,00	11,1	11,3	27,7	3,4	0,4
C ₁₆₌₁	1,19	2,7	2,3	8,0	0,6	1,1
C ₁₇₌₀	1,42	0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1
C ₁₇₌₁	1,65	0,1	<0,1	0,4	<0,1	<0,1
C ₁₈₌₀	1,99	1,0	1,9	4,9	0,3	0,8
C ₁₈₌₁	2,23	49,0	54,9	36,4	75,5	71,5
C ₁₈₌₂	2,86	27,0	25,1	11,3	19,7	22,2
C ₁₈₌₃	3,94	7,0	3,4	0,9	0,4	3,6

Tabelle 34: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *T. utilis*; Kulturbedingungen: Oberflächenkultur auf 1/4 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 96 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, StE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} d. Fs ME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	0,2	0,1	2,3	<0,1	-
C ₁₂₌₁	0,42	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	-
	0,52	0,6	0,4	-	<0,1	0,4
C ₁₄₌₀	0,55	0,3	0,1	5,0	<0,1	0,1
C ₁₄₌₁	0,64	-	-	0,2	<0,1	0,1
C ₁₅₌₀	0,76	<0,1	<0,1	1,9	<0,1	-
C ₁₅₌₁	0,89	0,1	<0,1	0,5	<0,1	-
C ₁₆₌₀	1,00	20,4	17,0	31,9	20,1	1,3
C ₁₆₌₁	1,19	4,3	4,0	8,0	4,4	2,4
C ₁₇₌₀	1,42	<0,1	<0,1	0,5	-	<0,1
C ₁₇₌₁	1,65	0,1	0,1	0,8	<0,1	0,1
C ₁₈₌₀	1,99	0,6	0,6	6,4	1,2	0,1
C ₁₈₌₁	2,23	60,6	66,1	36,3	59,8	85,9
C ₁₈₌₂	2,86	11,5	10,3	5,1	11,0	8,7
C ₁₈₌₃	3,94	1,1	0,8	0,6	3,3	0,3

Tabelle 35: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *T. utilis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/2 N-WÖLTJE-Lsg. mit 1 % Natriumacetat als Kohlenstoffquelle; Ernte nach 12 h.

Fettsäuren	V _{rel} d. Fs ME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	StE
C ₁₂₌₀	0,32	<0,1	<0,1	0,3	<0,1	<0,1
C ₁₂₌₁	0,42	<0,1	-	<0,1	<0,1	-
	0,52	0,3	0,6	0,3	<0,1	0,2
C ₁₄₌₀	0,55	<0,1	0,2	0,9	<0,1	0,1
C ₁₄₌₁	0,64	1,1	4,5	2,3	<0,1	1,1
C ₁₅₌₀	0,76	<0,1	<0,1	0,3	<0,1	<0,1
C ₁₅₌₁	0,89	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1
C ₁₆₌₀	1,00	10,2	8,1	13,5	10,1	0,6
C ₁₆₌₁	1,19	2,0	1,2	4,6	2,4	0,5
C ₁₇₌₀	1,42	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C ₁₇₌₁	1,65	0,1	0,1	0,1	0,1	<0,1
C ₁₈₌₀	1,99	0,1	0,2	1,0	1,4	0,3
C ₁₈₌₁	2,23	49,3	61,2	34,8	57,8	76,3
C ₁₈₌₂	2,86	33,9	23,1	34,1	25,0	10,2
C ₁₈₌₃	3,94	2,6	0,3	7,3	3,0	0,4

Tabelle 36: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *T. utilis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 h Umpflanzung auf 1/2 N-WÖLTJE-Lsg. mit 1% Natriumacetat als Kohlenstoffquelle; Ernte nach 24 h.

Fettsäuren	V _{rel} d. FsME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	SfE
C ₁₂₌₀	0,32	0,1	<0,1	0,2	<0,1	<0,1
C ₁₂₌₁	0,42	-	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	0,52	0,2	0,1	-	<0,1	<0,1
C ₁₄₌₀	0,55	0,1	<0,1	0,7	<0,1	<0,1
C ₁₄₌₁	0,64	2,8	0,7	2,0	0,2	<0,1
C ₁₅₌₀	0,76	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1
C ₁₅₌₁	0,89	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1
C ₁₆₌₀	1,00	9,2	12,5	14,0	10,2	0,4
C ₁₆₌₁	1,19	1,4	2,3	3,0	1,6	0,3
C ₁₇₌₀	1,42	<0,1	<0,1	0,2	0,1	<0,1
C ₁₇₌₁	1,65	<0,1	<0,1	0,2	0,1	<0,1
C ₁₈₌₀	1,99	0,1	1,3	0,9	0,6	0,2
C ₁₈₌₁	2,23	46,9	57,4	42,6	71,4	74,4
C ₁₈₌₂	2,86	38,0	23,1	32,3	13,7	23,9
C ₁₈₌₃	3,94	0,7	2,4	3,5	1,9	0,7

Tabelle 37: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der einzelnen Lipidkomponenten von *T. utilis*; Kulturbedingungen: Umpflanzkulturen, Vorzucht auf 1/1 N-WÖLTJE-Lsg., nach 96 Umpflanzung auf 1/2 N-WÖLTJE-Lsg. mit 1% Natriumacetat als Kohlenstoffquelle; Ernte nach 36 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (DAG = Diacylglycerine, Fs = freie Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine, SfE = Sterinfettsäureester.)

Fettsäuren	V _{rel} d. FsME	1, 2-DAG	1, 3-DAG	Fs	TAG	SfE
C ₁₂₌₀	0,32	0,9	0,1	0,4	<0,1	<0,1
C ₁₂₌₁	0,42	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	0,52	0,2	2,0	0,4	<0,1	<0,1
C ₁₄₌₀	0,55	<0,1	0,2	0,6	<0,1	0,1
C ₁₄₌₁	0,64	1,9	7,3	6,3	<0,1	0,4
C ₁₅₌₀	0,76	<0,1	<0,1	0,2	<0,1	<0,1
C ₁₅₌₁	0,89	<0,1	0,2	0,2	<0,1	<0,1
C ₁₆₌₀	1,00	11,0	7,6	9,1	12,6	0,8
C ₁₆₌₁	1,19	2,3	1,6	2,3	2,3	0,9
C ₁₇₌₀	1,42	<0,1	0,2	<0,1	<0,1	<0,1
C ₁₇₌₁	1,65	<0,1	0,3	<0,1	0,1	<0,1
C ₁₈₌₀	1,99	1,5	0,3	8,7	1,1	0,2
C ₁₈₌₁	2,23	48,5	58,7	43,9	54,2	69,5
C ₁₈₌₂	2,86	31,2	20,6	20,6	27,4	26,0
C ₁₈₌₃	3,94	2,0	0,6	7,0	2,1	1,8

Tabelle 38: Prozentuale Verteilung der Fettsäuren von freien Fettsäuren und Triacylglycerinen von *T. utilis*; Kulturbedingungen: Schüttelkultur in 1/1 N-WÖLTJE-Lsg. nach 18 h Submerskultur in 1/2 N-WÖLTJE-Lsg.; Ernte nach 48 h.

Die Analysenwerte sind Prozentwerte des Gesamtfettsäuregehalts jeweils einer Lipidkomponente (= 100 %). (Fs = Fettsäuren, TAG = Triacylglycerine.)

Fettsäuren	V _{rel} der FsME	Fs	TAG
C ₁₂₌₀	0,32	} <0,1	} <0,1
C ₁₂₌₁	0,42		
	0,52		
C ₁₄₌₀	0,55		
C ₁₄₌₁	0,64		
C ₁₅₌₀	0,76		
C ₁₅₌₁	0,89	} 9,4	} 23,3
C ₁₆₌₀	1,00		
C ₁₆₌₁	1,19		
C ₁₇₌₀	1,42		
C ₁₇₌₁	1,65		
C ₁₈₌₀	1,99		
C ₁₈₌₁	2,23	41,2	44,4
C ₁₈₌₂	2,86	25,6	11,5
C ₁₈₌₃	3,94	5,1	2,2

ANHANG III

Lösungsmittel:

Äthanol, p.A. absolut, Fa.MERCK

Benzol, Fa. MERCK, reinst, wurde zur Entfernung von Wasser über eine Aluminiumoxid-Säule, basisch, Aktivitätsstufe I, gereinigt (siehe WOELM-Informationen, Adsorptionsmittel zur Chromatographie).

Chloroform, reinst, Fa.MERCK, wurde vor dem Gebrauch zur Entfernung von Wasser und Säurespuren mit basischem Aluminiumoxid, Aktivitätsstufe I, gereinigt (s. WOELM-Informationen, Adsorptionsmittel zur Chromatographie).

Diäthyläther, reinst, Fa.MERCK, wurde zur Entfernung von Peroxiden und Wasser vor dem Gebrauch mit basischem Aluminiumoxid, Aktivitätsstufe I, gereinigt (s. WOELM-Informationen, Adsorptionsmittel zur Chromatographie).

Eisessig, p.A., Fa.MERCK

Petroleumbenzin, 40-60, Fa.MERCK, reinst (Petroläther)

n-Hexan, rein, Fa.MERCK, mind. 95% .

G. Literaturverzeichnis

- ACKMANN, R.G.: Fundamental groups in the response of flame ionization detectors to oxygenated aliphatic hydrocarbons.
J. Gas Chromatogr. 2, 173-179 (1964)
- AHEARN, D.G., F.J.ROTH, Jr., S.P.MEYERS: A comparative study of marine and terrestrial strains of *Rhodotorula*.
Can. J. Microbiol. 8, 121-132 (1962)
- ATKIN, L., P.P.GRAY, W.MOSES, M.FEINSTEIN: Growth and fermentation factors for different brewery yeasts.
Biochim. Biophys. Acta 3, 692-708 (1949 a)
- BABIJ, T., F.J.MOSS, B.J.RALPH: Effects of oxygen and glucose levels on lipid composition of yeast *Candida* [*Torulopsis*] *utilis* grown in continuous culture.
Biotechn. Bioeng. 11, 593-603 (1969)
- BERNHAEUER, K., A.NIETHAMMER, J.RAUCH: Beiträge zur mikrobiologischen Eiweiß- und Fettsynthese. II. Mitteilung.
Biochem. Z. 319, 94-101 (1948)
- BLANK, M.L., A.J.SCHMIDT, O.S.PRIVETT: Quantitative Analysis of Lipids by Thin-Layer Chromatography.
J. Am. Oil Chem. Soc. 41, 371-376 (1964)
- BROWN, C.M., A.H.ROSE: Fatty acid composition of *Candida utilis* as affected by growth temperature and dissolved oxygen tension.
J. Bacteriol. 99, 371-378 (1969)
- CAMA, F.J., V.H.EDWARDS: Single-Cell Protein from Chemical Wastes. The Growth of *Candida utilis* on Sodium Acetate.
Hokko Kagaku Zasshi 48, 787-794 (1970)
- CHALLINOR, S.W., N.W.R.DANIELS: Fat Production by Inositol-deficient Yeast.
Nature, London 176, 1267-1268 (1955)
- CHANG, W.-S., W.H.PETERSON: Factors affecting the biotin content of yeasts.
J. Bacteriol. 58, 33-44 (1949)
- DAWSON, P.S.S.: Cell cycle and post cycle changes during continuous phased growth of *Candida* [*Torulopsis*] *utilis*.
Can. J. Microbiol. 16, 783-795 (1970)

- DAWSON, P.S.S., B.M.CRAIG: Lipids of *Candida utilis* changes with growth.
Can. J. Microbiol. 12, 775-785 (1966)
- DREPHAL, G.: Untersuchungen über die Nicotinsäure-Bildung und Nicotinsäureamid-
Desaminase in *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis*.
Dissertation, Marburg (1968)
- ECKERT, L.: Der Einfluß verschiedener N-Quellen auf die spezifischen Aktivitäten
der Enzyme des Ornithinzyklus bei *Endomycopsis vernalis*
und *Torulopsis utilis*.
Dissertation, Marburg (1968)
- FINK, H., H.HAEHN, W.HOERBURGER: Über die Versuche zur Fettgewinnung
mittels Mikroorganismen mit besonderer Berücksichtigung der
Arbeiten des Instituts für Gärungsgewerbe.
Chem. Ztg. 61, 689-693, 723-726, 744-747 (1937)
- FINK, H., J.KREBS, R.LECHNER: Nachtrag zu unseren Arbeiten über die Fetthefer-
gewinnung in Holzzuckerlösungen. Ein Beitrag zur biologischen
Eiweißsynthese.
Biochem.Z. 290, 135-136 (1937)
- FULCO, A.J.: Chain Elongation, 2-Hydroxylation and Decarboxylation of Long Chain
Fatty Acids by Yeast.
J.Biol.Chem. 242, 3608-3613 (1967)
- GEFFERS, H.: Untersuchungen über das Fettbildungsvermögen bei Pilzen der Gattung
Oospora WALLROTH (em. SACC.)
Arch. Mikrobiol. 8, 66-98 (1937)
- HAEHN, H., W.KINTTOF: Beiträge über den chemischen Mechanismus der Fettbildung
aus Zucker.
Chem. Zelle und Gewebe 12, 115-156 (1925)
- HARRISON, J.S., W.E.TREVELYAN: Phospholipid Breakdown in Baker's Yeast
during Drying.
Nature, London 200, 1189-1190 (1963)
- HEIDE, S.: Zur Physiologie und Cytologie der Fettbildung bei *Endomycopsis*
*vernal*is.
Arch. Mikrobiol. 10, 135-188 (1939)

- HITCHCOCK, C., B.W.NICHOLS (Herausgeber): Plant Lipid Biochemistry.
Academic Press, London u. New York (1971)
- HUNTER, K., A.H.ROSE: in "The Yeast", Bd. 2, S.211 ff.
Herausgeber: A.H.ROSE u. J.S.HARRISON
Academic Press, London u. New York (1971)
- JANTZEN, F., H.ANDREAS: Reaktion ungesättigter Fettsäuren mit Quecksilber(II)-acetat; Anwendung für präparative Trennungen, I.
Chem.Ber. 92, 1427-1437 (1959)
- JUNGnickel, F.: Orthophosphorsäuremonoester-Phosphohydrolaseaktivität der repressiven Pyrophosphat-Phosphohydrolase I von *Candida utilis*.
Zeitschr. allg. Mikrobiol. 12, 451-457 (1972)
- KAISER, R.: Chromatographie in der Gasphase. 4. Teil: Quantitative Auswertung, S. 201 ff. Bibliographisches Institut, Mannheim, Hochschultaschenbücher-Verlag (1965)
- KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 9. Auflage. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1974)
- KATING, H.: Die Nutzung verschiedener N-Quellen durch *E. vernalis*.
Arch. Mikrobiol. 22, 235-247 (1955 a)
- - Über die Aktivität der Zelloberfläche bei der Assimilation von Amino- und Amidstickstoff durch *E. vernalis*.
Arch. Mikrobiol. 22, 368-395 (1955 b)
- - Über das Amidspaltungsvermögen von *Endomycopsis vernalis*, *Torulopsis utilis* und *Willia anomala*.
Arch. Mikrobiol. 32, 207-218 (1959)
- KATING, H., W.RINN, G.WILLUHN: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von *Arnica*.
Planta Medica 18, 130-146 (1970)
- KERÄNEN, A.J.A.: Antonie van Leeuwenhoek 35 (1969), Suppl., Third International Symposium on Yeasts, Delft - The Hague, pp H7-H8, zitiert in "The Yeast"; Herausgeber: A.H.ROSE u. J.S.HARRISON, Academic Press, London u. New York (1971)

- KLEMM, R.: Die Wirkung von Essigsäure und anderen aliphatischen Carbonsäuren auf das Wachstum von *Endomycopsis vernalis*.
Arch. Mikrobiol. 40, 403-417 (1961)
- KOT, B., A. NERYNG, F. SOBCZAK: Charakterystyka składu kwasów tłuszczowych w wybranych szczepach drożdży paszowych. (Composition of fatty acids in fodder yeast.)
Przem. Ferment. Rolny 13, 16-18 (1969) (pol.)
- KRAUEL, H., R. KUNZE, H. WEIDE: Bildung von Dicarbonsäuren durch *Candida guilliermondii*, Stamm H 17, aus n-Alkanen.
Z. allg. Mikrobiol. 13, 55-58 (1973)
- KUBELKA, P., F. MUNK: Z. Techn. Physik 12, 593 (1931)
- KUHN, N. J., F. LYNEN: Phosphatidic Acid Synthesis in Yeast.
Biochem. J. 94, 240-246 (1965)
- KUSSMAUL, H.: Direkte quantitative Dünnschichtchromatographie: Remissionsmessung und digitale Auswertung.
Dissertation, Marburg (1972)
- LACKNER, H., H. FLASCHKA: Mikromethoden im Farben- und Lacklaboratorium. II. Mitteilung: Die Bestimmung der Säurezahl von Ölen.
Fette u. Seifen 52, 737-739 (1950)
- LEONIAN, R. H., K. G. LILLY: The effect of vitamins on ten strains of *Saccharomyces cerevisiae*.
Am. J. Bot. 29, 459-464 (1942)
- LIER, J. F., K. L. SMITH: Gaschromatographic recognition of cholesterol metabolites and artefacts.
Analytical Biochem. 24, 419-430 (1968)
- LINDEGREN, C. C.: The induction of dormancy in yeast cells by fat and carbohydrate storage and conditions for reactivation.
Arch. Biochem. 8, 119-134 (1945)
- LUCKNER, M.: Der Sekundärstoffwechsel in Pflanze und Tier.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1969)
- MAAS-FÖRSTER, M.: Der Fett- und Eiweißstoffwechsel von *Endomycopsis vernalis* unter dem Einfluß von Phosphor- und Kaliummangel.
Arch. Mikrobiol. 22, 115-144 (1955)

- McMURROUGH, A.H. ROSE: Effects of Temperature Variation on the Fatty Acid Composition of *Candida utilis*.
J. Bacteriol. 107, 753-758 (1971)
- MACKENZIE, D.W.R., B.J. AURET: *Rhodotorula nitens* sp. nov.
Isolated from the Atmosphere.
J. gen. Microbiol. 31, 171-177 (1963)
- MANGOLD, H.K., D.C. MALINS: Fractionation of fats, oils and waxes on thin-layers of silic acid.
J. americ. Oil Chem. Soc. 37, 383-385 (1960)
- MANGOLD, H.K., R. KAMMERECK: Separation, identification, and quantitative analysis of fatty acids by thin-layer chromatography and gas-liquid chromatography.
Chem. and Ind. (London), 1032-1034 (1961)
- MARTIN, H.: Beiträge zur Kenntnis der Morphologie und Physiologie der Necktarhefe *Candida reukaufii* (GRÜSS) DIDDENS et LODDER.
Arch. Mikrobiol. 20, 141-162 (1954)
- MEYER, F., K. BLOCH: Effect of temperature on the enzymatic synthesis of unsaturated fatty acids in *Torulopsis utilis*.
Biochim. Biophys. Acta 77, 671-673 (1963)
- v. NÄGELI, C., O. LOEW: Über die chemische Zusammensetzung der Hefe.
Liebigs Ann. 193, 322-348 (1878)
- - -
Über die Fettbildung bei niederen Pilzen.
J. prakt. Chem. 21, 97-114 (1880)
- NÜRNBERG, E.: Ultraschall-Erzeugung, Wirkungen und Anwendung aus pharmazeutischer Sicht.
Dt. Apotheker Ztg. 49, 1895-1900 (1971)
- OETTE, K., M. DOSS: Mikromethoden zur schnellen Untersuchung von Lipoiden auf Dünnschichtplatten mit Natriummethylat für die gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester.
J. Chromatogr. 32, 439-450 (1968)

- OGATA, K., H.NISHIKAWA; M.OHSUGI: Production of yeast. III. Acetate utilization for yeast cell growth as a sole carbon source.
Hakko Kogaku Zasshi 48, 478-484 (1970) (japan.)
CA 73: 119179n
- PRIVETT, O.S., M.L.BLANK: A new method for the analysis of component mono-, di- and triglycerides.
J. Lipid Res. 2, 37-44 (1961)
- RAAF, H.: Beiträge zur Kenntnis der Fett- und Eiweißsynthese bei *Endomy-copsis vernalis* und einigen anderen Mikroorganismen.
Arch. Mikrobiol. 12, 131-181 (1941)
- REHM, K.D.: Untersuchungen zur Analytik und über das Vorkommen von Hydroxy-fettsäuren im Pflanzenreich.
Dissertation, München (1967)
- ROSE, A.H., J.S.HARRISON (Herausgeber): The Yeast, Bd. 2
Academic Press, London u. New York (1971)
- SCHULTE, K.E., G.RÜCKER: Polyacetylene und einige andere neue Inhaltsstoffe der Arnica-Blüten.
Archiv der Pharmazie 299, 468-480 (1966)
- SCHULZE, K.L.: Beiträge zur Physiologie und Technologie der Fettbildung bei Mikroorganismen.
Arch. Mikrobiol. 15, 315-351 (1950)
- SHAFAL, T., L.M.LEWIN: Effects of myo-inositol deficiency upon the lipid composition of the yeast, *S.carlbergensis*.
Biochim. Biophys. Acta 152, 787-790 (1968)
- STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch, 2.Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967)
- STEINER, M.: Zur Verwendung von Permutit bei Stoffwechselversuchen mit Mikroorganismen.
Biochem. Z. 307, 330-332 (1941)
- Die Physiologie der Fettbildung und Fettspeicherung bei niederen Pflanzen. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. VII, S. 209 ff., Herausgeber: W.RUHLAND, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Göttingen (1957)

- STEINER, M., H.KATING: Zur Frage der gekoppelten Transaminierungs-Desaminierungsreaktionen beim Asparaginsatz durch *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis*.
Biochem. Z. 322, 488-494 (1960)
- TALAMO, B., N.CHANG, K.BLOCH: Desaturation of oleyl phospholipid to linoleyl phospholipid in *Torulopsis utilis*.
J. Biol. Chem. 248, 2738-2742 (1973)
- TARWIDOWA, H.: Über die Entstehung der Lipidtröpfchen bei *Basidiobolus ranarum*.
Cellule 47, 205-216 (1938)
- TOUCHSTONE, J.C. (Herausgeber): Quantitative Thin-layer Chromatography.
Verlag: John Wiley & Sons, New York (1973)
- WAGNER, H., P.POHL: Zur Analytik von Polyenfettsäuren. I.
Biochem. Z. 340, 337-344 (1964)
- WEINFURTER, F., F.ESCHENBECHER, W.D.BORGES: Zum Wuchsstoffbedarf von *Saccharomyces carlbergensis*.
Zentr.bl. Bakt. Parasit. Kde. Abt. II 113, 134-162 (1959)
- WHITE, D., H.P.KLEIN: Effect of α -glycerolphosphate and of Palmityl-Coenzym A on Lipid Synthesis in Yeast Extracts.
J. Bacteriol. 91, 1218-1223 (1966)
- WILLIAMS, R.J., R.F.EAKIN, F.E.SNELL: The Relationship of Inositol, Thiamin, Biotin, Pantothenic Acid and Vitamin B₆ to the Growth of Yeast.
J. Am. Chem.Soc. 62, 1204-1207 (1940)
- WITTER, B.: Die Lipide von *Endomycopsis vernalis* bei verschiedener Stickstoff-Ernährung.
Dissertation, Bonn (1972)
- WITTER, B., H.DEBUCH, M.STEINER: Die Lipide von *Endomycopsis vernalis* bei verschiedener Stickstoff-Ernährung.
Arch. Mikrobiol. 101, 321-335 (1974)
- WÖLTJE, W.: Unterscheidung einiger *Penicillium*-Species nach physiologischen Merkmalen.
Zbl. Bakt. II. Abt. 48, 97-130 (1918)

- YANG, H.-C., M.KUSUMOTO, S.IWAHARA, T.TOCHIKURA, K.OGATA:
Degradation of d-Biotin by microorganisms. I. d-Biotin degradation by yeast and molds.
Agr.Biol.Chem. 33, 1730-1736 (1969)
- YANG, H.-C., M.KUSUMOTO, T.TOCHIKURA, K.OGATA: Degradation of d-Biotin by microorganisms. II. Isolation and characterization of unknown biotin vitamers produced with d-biotin by *Endomycolopsis* sp.
Agr.Biol.Chem. 34, 370-374 (1970)
- YUAN, C., K.BLOCH: Conversion of Oleic Acid to Linoleic Acid.
J.Biol.Chem. 236, 1277-1279 (1961).

Lebenslauf

Ich wurde als Tochter des aktiven Hauptmanns Hermann Ertel (gef. 1944) und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Hüttmann, am 17.7.1944 in Ernstthal/Rennsteig geboren.

Von Ostern 1951 bis Ostern 1955 besuchte ich die Grundschule in Hamburg, anschließend das Gymnasium für Mädchen, Klosterschule, in Hamburg, wo ich im Januar 1964 die Reifeprüfung bestand. Von März bis September 1964 nahm ich an einem höheren Handelskursus in der Rackow-Schule in Hamburg teil.

Das Praktikum für Pharmazie absolvierte ich von Oktober 1964 bis September 1965 in der Apotheke des allg. Krankenhauses Barmbek in Hamburg, von Oktober bis Dezember 1965 in der Greifenberg-Apotheke, von Januar bis September 1966 in der Gartenstadt-Apotheke (beide Apotheken in Hamburg) und bestand im September 1966 die Pharmazeutische Vorprüfung in Hamburg.

Im WS 1966/67 begann ich das Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität, Marburg, und legte im Oktober 1969 die Pharmazeutische Prüfung ab.

Im November 1969 begann ich am Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität, Marburg, unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Kating die vorliegende Arbeit, deren praktischen Teil ich im Juni 1974 zum Abschluß brachte. Von November 1969 bis März 1975 war ich in diesem Institut als wissenschaftliche Angestellte beschäftigt.

Seit 1969 bin ich mit dem Dipl. Physiker Hartmut Fischer verheiratet.

